

University of Groningen

Geglycosyleerd haemoglobine. Een nieuwe parameter voor diabetesregulatie?

Essen, Lammert Herman van

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1982

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Essen, L. H. V. (1982). *Geglycosyleerd haemoglobine. Een nieuwe parameter voor diabetesregulatie?* [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

GEGLYCOSYLEERD HAEMOGLOBINE

**Een nieuwe parameter
voor diabetesregulatie?**

L.H. van Essen

GEGLYCOSYLEERD HAEMOGLOBINE
Een nieuwe parameter voor diabetesregulatie?

Stellingen

I.

Het routinematig toedienen van glucocorticoïden als onderdeel van therapeutische maatregelen bij een septische shock is niet gefundeerd.

II.

De kolomchromatografische bepaling van HbA_{1c} is onbetrouwbaar bij nierinsufficiëntie.

III.

De verbetering van de nierfunctie na percutane transluminale angioplastiek bij een enkelzijdige nierarteriestenose is vermoedelijk niet alleen secundair aan de verbetering van de nierdoorbloeding aan de ipsilaterale zijde, doch ook het gevolg van het opheffen van de angiotensine gemedieerde vasoconstrictie aan de contralaterale zijde.

IV.

Spiegels aan geglycosyleerd haemoglobine zijn geen goede maatstaf voor diabetesregulatie bij patiënten met een labiele diabetes mellitus.

V.

Bij levertransplantatie is, teneinde een goede haemostase te verkrijgen, het op tijd geven van plaatjes transfusie minstens zo belangrijk als het geven van vers plasma en plasma-componenten.

VI.

Het risico van het gebruik van kaliumretinerende diuretica door patiënten met een insuline-afhankelijke diabetes mellitus wordt onderschat.

VII.

De werkzaamheid van hoge doses medroxyprogesteron acetaat bij de behandeling van het gemetastaseerde mammacarcinoom bij postmenopauzale patiënten berust mogelijk op de door medicament of zijn metabolieten veroorzaakte bijniersuppressie.

VIII.

Bij patiënten met een chronische nierinsufficiëntie dient, in een vroeger stadium dan tot op heden gebruikelijk, eiwitbeperking in het dieet te worden toegepast.

IX.

De uit 1975 daterende aanbeveling van Ditzel het dieet van patiënten met diabetes mellitus met fosfaat te verrijken, moet worden verworpen in het licht van de huidige inzichten in het ontstaan van chronische nierafwijkingen.

X.

Saneren in de gezondheidszorg betekent niet gezond maken.

XI.

Het landelijk georganiseerde cursorisch onderwijs voor artsen in de eerste twee jaren van opleiding tot internist is niet ingepast in de werkbelasting van deze groep; daarnaast sluit de inhoud ervan niet aan bij hetgeen in deze fase van oriëntatie prioriteit geniet. In deze vorm is het derhalve een kort leven beschoren.

XII.

Korting van de Overheidsuitgaven in het kader van de gezinsverzorging is uiting van een kortzichtig beleid.

Stellingen
behorende bij het proefschrift van
L. H. van Essen
GEGLYCOSYLEERD HAEMOGLOBINE
Een nieuwe parameter voor diabetesregulatie?
Groningen, 1982

RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

GEGLYCOSYLEERD HAEMOGLOBINE

Een nieuwe parameter voor diabetesregulatie?

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van het doctoraat in de geneeskunde
aan de Rijksuniversiteit te Groningen
op gezag van de Rector Magnificus Dr. L.J. Engels
in het openbaar te verdedigen op woensdag 2 juni 1982
des namiddags te 2.45 uur precies
door

LAMMERT HERMAN VAN ESSEN
geboren te Enschede

Promotores: Prof. Dr. W.D. Reitsma
Prof. Dr. H. Doorenbos
Referent: Dr. W.J. Sluiter

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht op de afdeling klinische endocrinologie (hoofd prof. dr. H. Doorenbos) van de kliniek voor inwendige geneeskunde (hoofd prof. dr. E. Mandema).

Mevr. A. Bos-Wijma verzorgde het typewerk.

De tekeningen werden vervaardigd door dhr. J. Brouwer.

Mijn grote dank betuig ik aan prof. dr. W.D. Reitsma, dr. W.J. Sluiter en prof. dr. H. Doorenbos, en verder aan allen, die mij geholpen hebben bij het tot stand komen van dit proefschrift.

De wet van Hofstadter:

'IT ALWAYS TAKES LONGER THAN YOU EXPECT,
EVEN WHEN YOU TAKE INTO ACCOUNT HOFSTADTER'S LAW'

INHOUD

HOOFDSTUK 1

Glycosylatie van haemoglobine en andere eiwitten; een overzicht	
1.1 De 'snelle haemoglobines'	2
1.2 De geglycosyleerde haemoglobines; structuuranalyse; wijze van ontstaan	2
1.3 Bepalingsmethoden	5
1.3.1 Chromatografische methoden	5
1.3.1.1 Macro-kolom methode	5
1.3.1.2 Micro-kolom methode	6
1.3.1.3 High-pressure liquid chromatography (H.P.L.C.)	6
1.3.2 Iso-electro-focusing	6
1.3.3 Agar-electroforese	7
1.3.4 Colorimetrische methode	7
1.4 Plaatsen binnen het haemoglobine, waar glycosylatie plaatsvindt	7
1.5 Relatie van de percentuele hoeveelheid geglycosyleerd haemoglobine met de regeling van diabetes mellitus; literatuur-gegevens	8
1.5.1 gsHb Bij patiënten met 'chemische' diabetes mellitus	9
1.5.2 gsHb Bij patiënten met diabetes mellitus, behandeld met uitsluitend dieet, of met een dieet in combinatie met orale antidiabetica (N.I.D.D.M. – non-insulin dependent diabetes mellitus)	9
1.5.3 gsHb Bij met insuline behandelde patiënten met diabetes mellitus (I.D.D.M. – insulin dependent diabetes mellitus)	9
1.5.4 Bepaling van gsHb als diagnosticum voor diabetes mellitus	10
1.6 Effect van glycosylatie op de functie van het haemoglobine	10
1.7 Glycosylatie van eiwitten, anders dan haemoglobine; mogelijke relatie met het ontstaan van late complicaties bij diabetes mellitus	12
1.7.1 Glycosylatie van serum-albumine	12
1.7.2 Mogelijke relatie van glycosylatie van eiwitten en het ontstaan van late complicaties bij diabetes mellitus	13

HOOFDSTUK 2

Laboratoriumbepalingen en statistische bewerking	
2.1 De thiobarbituurzuurreactie	15
2.1.1 Principe	15
2.2. Bepaling van geglycosyleerd Hb. door middel van de T.B.A.-test	15
2.2.1 Uitvoering	15
2.2.1.1 Haemolysaat	15
2.2.1.2 Reagentia voor de T.B.A.-reactie op haemoglobine	16
2.2.1.3 Opzet van de gsHb-bepaling volgens de T.B.A.-methode	17
2.2.1.4 Bepalingsvoorschrift	18

2.2.2 De reactietijd	18
2.2.3 De pH-afhankelijkheid	19
2.2.4 De productiesnelheid van HMF uit terminale en intrachain glucosylering	19
2.2.5 gsHb-waarden Bij normalen	21
2.2.6 Variabiliteit van de bepaling	21
2.3 Bepaling van haemoglobine gehalte, bloedglucose, C-peptide- en insuline-spiegels	21
2.4 Statistische bewerking	21

HOOFDSTUK 3

Vraagstelling; patiënten en methoden

3.1 Vraagstelling	22
3.2. Patiënten en proefopzet	22

HOOFDSTUK 4

Klassieke diabetes-contrôle en gsHb-waarden

4.1 Bewerking van de 'klassieke' parameters, verkregen bij de poliklini- sche contrôles	24
4.2 Relatie van de 'klassieke' parameters en gsHb-spiegels	24
4.2.1 Relatie bij alle patiënten uit groep A en B tezamen, en bij alle patiënten uit groep A, resp. B afzonderlijk	25
4.2.2 Relatie bij individuele patiënten uit groep B	25
4.2.3 Relatie bij individuele patiënten uit groep A	28
4.2.4 Bespreking van de resultaten	28

HOOFDSTUK 5

Endogene insuline-reserve, diabetesregulatie en gsHb-spiegels

5.1 Inleiding	34
5.2 Resultaten	34
5.3 Bespreking van de resultaten	35

HOOFDSTUK 6

Een mathematisch model betreffende de kinetiek van de glycosylering van het haemoglobine

6.1 Inleiding	37
6.2 Beschrijving van het model	37
6.2.1 HbA ₁ -concentratie in één erythrocyt	37
6.2.2 De gemiddelde HbA ₁ -concentratie	39

6.2.3 Wijzigingen van de HbA ₁ -fractie in relatie tot wijzigingen in de glucosespiegel	40
6.3 Conclusies	43

HOOFDSTUK 7

Verloop van gsHb-spiegels bij snelle correctie van hyperglycaemie door middel van Continue Subcutane Insuline-Infusie (C.S.I.I.)

7.1. Inleiding	47
7.2 Verloop van gsHb-spiegels bij drie patiënten tijdens behandeling met continue subcutane insuline-infusie; toepasbaarheid van het kinetisch model in deze situatie	48

HOOFDSTUK 8

Geglycosyleerd plasma-proteïne

8.1. Inleiding	51
8.2 Bepaling van geglycosyleerd proteïne door middel van de thiobarbituurzuur-methode	51
8.2.1 Principe	51
8.2.2 Bepalingsvoorschrift	52
8.3 Verloop van geglycosyleerd proteïne en geglycosyleerd haemoglobine bij twee patiënten met insuline afhankelijke diabetes mellitus	52
8.3.1 Opzet van het onderzoek; resultaten	52
8.3.2 Bespreking van de resultaten	53
8.4 Verloop van geglycosyleerd haemoglobine en geglycosyleerd proteïne bij twee, niet-diabetische patiënten, tijdens behandeling van een pernicieuze anaemie	56
8.4.1 Inleiding	56
8.4.2 Onderzoek en bespreking van resultaten	56
Summary	60
Litteratuur	65
Appendix A	72
Appendix B	73

Colofon

Lettertype: Times

Papier: 135 grs halfmat M.C.

Omslag: Balacron

Druk: Bakker Baarn

INLEIDING

In de afgelopen jaren zijn vele studies verschenen over de eventuele betekenis van de bepaling van geglucoosyleerd haemoglobine als maat voor de regeling van diabetes mellitus. Uit deze studies zijn tegenstrijdige resultaten naar voren gekomen. Dit vormde de reden om in een gecontroleerde klinische opzet nader onderzoek te doen naar de relatie tussen de klassieke parameters voor diabetesregeling (glucose-uitscheiding in de urine en concentratie van glucose in bloed) en het gehalte aan geglucoosyleerd haemoglobine. Uit deze studie blijkt, dat deze relatie minder eenvoudig is dan veelal wordt verondersteld. Dit feit heeft aanleiding gegeven tot het opstellen van een model, waarmee de gevonden resultaten verklaard kunnen worden.

Hoofdstuk 1

GLYCOSYLATIE VAN HAEMOGLOBINE EN ANDERE EIWITTEN; EEN OVERZICHT

1.1 *De 'snelle haemoglobines'.*

Middels kation-uitwisselingschromatografie kunnen stoffen van elkaar gescheiden worden als er onderlinge verschillen in lading bestaan.

Als een haemolysaat aan kation-uitwisselingschromatografie wordt onderworpen, elueren een drietal relatief negatief geladen haemoglobine-subfracties voorafgaande aan het HbA_0 ($\alpha_2\beta_2$), de 'snelle haemoglobines'. Deze subfracties worden tezamen tot de HbA_1 -fractie gerekend, en naar volgorde van elutie respectievelijk het HbA_{1a} , het HbA_{1b} en het HbA_{1c} genoemd (4, 58, 22, 81). Bij methoden met een hoge resolutie is het mogelijk de HbA_{1a} -subfractie nog verder op te splitsen in het $\text{HbA}_{1a,1}$ en het $\text{HbA}_{1a,2}$ (38).

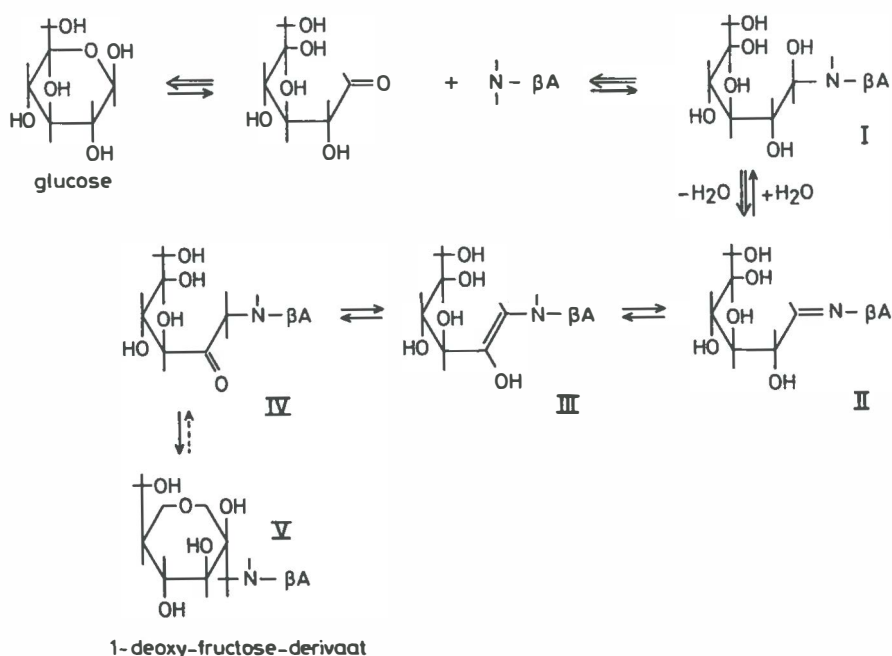
Bij kation-uitwisselingschromatografie elueert het HbF ($\alpha_2\gamma_2$) ongeveer ter hoogte van het HbA_{1c} ; de hoeveelheid aanwezig HbF is gewoonlijk dermate gering, dat het niet als een aparte piek op het chromatogram terug te vinden is. Het meer dan HbA_0 positief geladen HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) elueert na het HbA_0 . Bij benadering (o.m. afhankelijk van de lengte van de gebruikte kolom) is de opbrengst, uitgedrukt in procenten van totaal haemoglobine, van de verschillende (sub)fracties in het haemolysaat van een gezonde volwassene als volgt:

$\text{HbA}_{1a,1}$	0,2%	}	HbA_{1a}	0,4%	}	HbA_1	3,8%
$\text{HbA}_{1a,2}$	0,2%		HbA_{1b}	0,4%		HbA_0	90 %
			HbA_{1c}	3,0%		HbF	0,2%
						HbA_2	2,5%

1.2 *De geglycosyleerde haemoglobines; structuuranalyse; wijze van ontstaan.*

Het onderzoek naar de structuur van de subfracties van het HbA_1 heeft zich initieel gericht op de kwantitatief belangrijkste vertegenwoordiger ervan, het HbA_{1c} .

In 1966 bleek, dat de histonen van het HbA_{1c} dezelfde aminozuurvolgorde vertonen als het HbA_0 , doch dat aan de β -ketens een laagmoleculaire groep is gebonden met een Schiff-base structuur (56). In 1968 werd deze laag-moleculaire groep herkend als een hexose (9). Bunn identificeerde in 1975 deze hexose als glucose, en beschreef de vorming van het HbA_{1c} (12). Hierbij reageert de NH_2 -groep van het eindstandige valine in de β -ketens met glucose, waardoor een instabiel Schiff-base product ontstaat, dat na een Amadori-omlegging omgevormd wordt tot een stabiele ketoamine, het HbA_{1c} (zie figuur 1.1).



Figuur 1.1

Vorming van HbA_{1c}

I, II en III: 'instabiel' HbA_{1c} Schiffse basen

II → IV : Amadori-omlegging

V : stabiel eindproduct; HbA_{1c}

Zeer recent is gebleken, dat ook het HbA_{1a,1} en het HbA_{1a,2} ontstaan uit HbA₀ door binding van een suiker aan de eindstandige NH₂-groep in de β-ketens (38). Bij het HbA_{1a,1} is hier het fructose-1,6-difosfaat gebonden; bij het HbA_{1a,2} het glucose-6-fosfaat. De structuur van het HbA_{1b} is op dit moment nog niet exact bekend; in eerste instantie werd het beschouwd als een tussenproduct bij de glucosylatie van HbA₀ tot HbA_{1c} (55), doch later werden argumenten gevonden voor de directe vorming van HbA_{1c} uit HbA₀ (zoals in figuur 1.1 weergegeven); het HbA_{1b} wordt nu gezien als een afbraakproduct van het HbA_{1c}, dat ontstaat na verlies van een aminogroep in de β-ketens (87, 38). In vitro blijken meerdere gefosforyleerde hexosen en triosen, mits een vrije aldehyde- of ketongroep aanwezig is, een niet-enzymatische (vide infra) reactie met HbA₀ te kunnen aangaan. Toevoeging van 2,3-DPG blijkt telkenmale de reactiesnelheid te verminderen (zie ook onder 1.6). De reactieproducten van deze stoffen en HbA₀ zijn bij kation-uitwisselingschromatografie en isoelectro-focusing terug te vinden in de HbA₁-fractie (91, 55).

Teneinde het aspecifieke karakter van de post-synthetische omvorming van haemoglobine te benadrukken, kan worden vermeld dat (bij bv. neonaten en

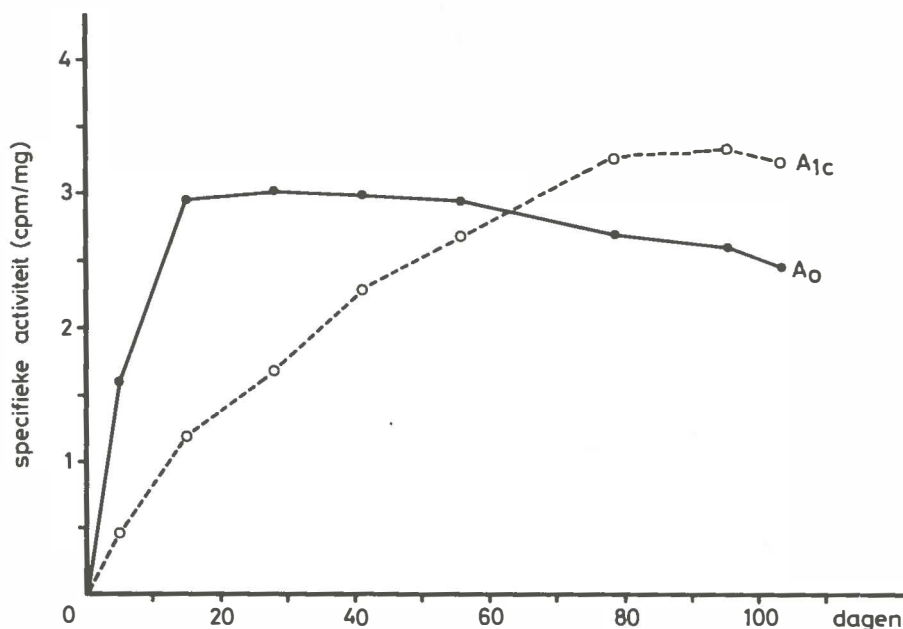
volwassenen met thalassaemia major) in vivo ook het HbF voor een gedeelte geglycosyleerd blijkt, waarbij deze producten bij kolomchromatografie voorafgaande aan het HbF elueren (HbF₁-fractie) (2). Van het HbF₁ is bekend, dat deze fractie voor een deel uit geglycosyleerde HbF bestaat, en voor een deel uit ge-acetyleerd HbF. Er zijn aanwijzingen, dat de acetylactie van HbF op een vroeg tijdstip in de HbF-synthese plaatsvindt, mogelijk al terwijl de γ -ketens nog aan de ribosomen gebonden zijn (2). Tenslotte blijkt het specifieke karakter van de post-synthetische omvorming van haemoglobine ook nog uit het feit, dat het HbA₀ eveneens een reactie met niet-suikers kan aangaan, zoals pyridoxaal-5'-fosfaat (55). Soortgelijke producten chromatograferen bij kation-uitwisselingschromatografie in de HbA₁-fractie, doch zullen kwantitatief nauwelijks aan de verschillende subfracties bijdragen.

De HbA₁-fractie blijkt dus te bestaan uit geglycosyleerde haemoglobine. De aanwezigheid van deze fractie is niet genetisch bepaald, zoals het geval is bij het HbA₂ en het HbF, waarvan de vorming onder controle staat van respectievelijk het δ - en het γ -globine-keten gen, doch ontstaat door binding van suiker aan het HbA₀.

De glycosylatie van haemoglobine is een zeer traag verlopende reactie, die gedurende de gehele levensduur van de erythrocyt plaatsheeft, en die niet enzymatisch verloopt. Het trage verloop van de glycosylatie blijkt uit de zeer lage HbA₁-opbrengst in een haemolysaat van reticulocyten, vergeleken met de hoge opbrengst in dat van een groep oude erythrocyten (58, 43). De snelheid, waarmee HbA_{1c} gevormd wordt, is fraai onderzocht door de groep van Bunn (13). Bij een gezonde vrijwilliger werd een bolus-injectie ⁵⁹Fe-transferrine toegediend, waarna met tussenpozen gedurende 100 dagen de specifieke activiteit werd gemeten van de HbA₀ en de HbA_{1c}-fractie. Het verloop van de specifieke activiteit, dat voor het HbA₀ werd gevonden, past bij dat van een cohort erythrocyten, waaraan een label wordt gebonden, en waarbij dit label gedurende de verdere levensduur van de erythrocyt hecht gebonden blijft. Voor de HbA_{1c}-fractie werd een met de tijd toenemende mate aan specifieke activiteit gemeten, passend bij een voortdurende vorming van haemoglobine binnen deze fractie gedurende de gehele onderzoeks-periode van 100 dagen (zie figuur 1.2).

Samenvattend kan worden gesteld, dat de glycosylatie van haemoglobine een fysiologisch proces is, dat non-enzymatisch, gedurende de gehele levensduur van de erythrocyt verloopt, als resultante enerzijds van de hoogte van de glucosespiegels, waaraan het haemoglobine wordt blootgesteld, anderzijds van de duur van de blootstelling.

Zo zal het HbA₁ verhoogd aanwezig zijn bij niet-optimaal geregelde diabetes mellitus, verlaagd bij bijvoorbeeld een haemolytische anaemie (57, 13); het kan normaal uitvallen bij een patiënt met onregelde diabetes mellitus, die aan haemolyse lijdt (64). Bepaling van het HbA₁ wordt door sommigen aangeraden als parameter voor haemolyse (24).



Figuur 1.2

In vivo labeling van haemoglobine A₀ (—●—) en A_{1c} (---○---) na infusie van [⁵⁹FE] transferrine (naar Bunn et al (13))

1.3 Bepalingsmethoden.

1.3.1 Chromatografische methoden.

1.3.1.1 Macro-kolom methode.

Trivelli et al. (96) publiceerden in 1971 een modificatie op de chromatografische methode van Schnek en Schroeder (81), die gekenmerkt wordt door relatieve eenvoud en grote betrouwbaarheid. Hierbij wordt een haemolysaat opgebracht op een kolom met een diameter van 2 cm. en een lengte van 17,5 cm. De snelheid van elutie van de verschillende haemoglobinefracties is afhankelijk van de respectieve lading ervan.

Na een initiële piek, bestaande uit eiwit, dat niet met haemoglobine gerelateerd is, elueert als eerste haemoglobine (sub)fractie het (sterkst negatief geladen) HbA_{1a}, gevolgd door achtereenvolgens het HbA_{1b}, HbA_{1c}, HbA₀ en het HbA₂ (zie ook onder 1.1). De 'snelle' haemoglobines elueren in 16 tot 20 uur; de elutie van het nog resterende haemoglobine vereist daarna nog 8 tot 10 uur. De verschillende fracties worden spectrofotometrisch gemeten; de grootte van de fracties wordt uitgedrukt in procenten van totaal haemoglobine.

1.3.1.2 Micro-kolom methode.

De micro-kolom methode is gebaseerd op het werk van Trivelli; het betreft een kation-uitwisselingschromatografische methode, die wordt uitgevoerd op een kolom van geringe lengte (1). Het scheidend vermogen is hierdoor gering; dientengevolge kan met deze methode slechts de totale HbA₁-fractie worden gemeten.

1.3.1.3 High-pressure liquid chromatography (H.P.L.C.).

Deze methode is eveneens een modificatie op de methode van Trivelli; bij H.P.L.C. wordt het haemolysaat op een korte kolom onder druk opgebracht. Het voordeel van deze methode ligt in de tijdswinst: de fracties HbA_{1a} + HbA_{1b}, HbA_{1c} en HbA₀ elueren in 27 minuten; is men niet geïnteresseerd in de HbA₁-subfracties, dan kan het systeem zodanig worden aangepast, dat de HbA₁-fractie in 11 minuten elueert (23, 50).

Een praktisch nadeel van de chromatografische methoden is, dat de instabiele Schiff-basen éénzelfde loopsnelheid hebben als de stabiele keto-amines. Indien bepaling van HbA_{1c} (of van HbA₁) wordt verricht na een recente, slechts korte tijd bestaand hebbende, hoge bloed-suikerspiegel, wordt de Schiff-base meegemeten. Indien een monster in dit geval wat later in de tijd afgenomen zou zijn, zou de hoeveelheid aan Schiff-base door dissociatie reeds weer sterk teruggelopen zijn zonder dat er keto-amine vorming is opgetreden. Een meting van het HbA_{1c} zou dan een veel lagere spiegel opleveren. Het probleem van het meemeten van het instabiele voorstadium van het HbA_{1c} bij chromatografie valt te voorkomen door het monster voorafgaande aan bepaling te incuberen in een glucosevrij medium (93, 98, 95).

Verder is gebleken, dat bepaling van geglucoosyleerd haemoglobine door middel van chromatografische methoden bij patiënten met uraemie vals verhoogde waarden oplevert. Verhoogde HbA_{1c}-waarden bij uraemische patiënten werden het eerst gerapporteerd door Casparie en Miedema in 1977 (15), en later door anderen bevestigd. Recent is gebleken (47), dat deze verhoogde waarden berusten op het bij chromatografische methoden meemeten van carbamyl-HbA, dat elueert met de HbA_{1c}- en de HbA_{1b}-piek. Carbamyl-HbA ontstaat bij uraemie door carbamylering van de NH₂-groep van het eindstandige valine in de β -keten van het haemoglobine; de spiegel ervan is sterk gereguleerd aan het serum-ureumgehalte. Bij colorimetrische methoden wordt bij bepaling van de hoeveelheid aan geglucoosyleerd haemoglobine carbamyl-haemoglobine niet meegemeten.

1.3.2 Iso-electro-focusing.

Bij deze methode wordt op poly-acrylamide gel in een pH-gradiënt hoogvoltag-electroforese toegepast; na focalisatie wordt het eiwit gepraecipiteerd en

eventueel gekleurd. De banden worden densitometrisch gekwantificeerd. Het HbF wordt hierbij gescheiden van het HbA_{1c}; dientengevolge is deze methode bij zeer jonge kinderen goed toepasbaar – dit in tegenstelling tot de chromatografische methoden (65, 82, 88).

1.3.3 Agar-electroforese.

Recent is een methode beschreven (71) door middel waarvan totaal-HbA₁ densitometrisch kan worden gemeten na agar-electroforese.

1.3.4 Colorimetrische methode.

Hierbij wordt het haemolysaat verhit onder zure omstandigheden, waardoor de aan haemoglobine gebonden hexosen worden gedehydrateerd. Na afscheiding van haemoglobine ontstaat 5-hydroxymethylfurfural, dat na samenvoeging met thiobarbituurzuur (T.B.A.) een geel product oplevert. Kwantificering geschiedt daarna colorimetrisch, en uitgedrukt in absorptie bij 443 nm. (45, 46). Nadere gegevens hierover worden onder hoofdstuk 2.1 vermeld.

Door sommigen is voor de colorimetrische bepaling van geglycosyleerd haemoglobine een matige correlatie gevonden met de HbA_{1c} bepaling volgens de macro-kolom methode van Trivelli (1); anderen vinden bij vergelijking met de T.B.A.-test zeer goede correlaties (78, 50).

Bij de T.B.A.-test worden instabiele voorstadia van de geglycosyleerde eindproducten niet meegemeten; de reactie, waarop de test berust, is zeer specifiek voor de stabiele keto-amine verbinding.

1.4 Plaatsen binnen het haemoglobine, waar glycosylatie plaatsvindt.

Dat een niet-enzymatisch verlopende reactie, als de vorming van HbA_{1c} uit HbA₀, een zo hoge mate aan structurele specificiteit zou vertonen, lijkt onwaarschijnlijk. Dat glycosylatie ook op andere plaatsen dan aan het terminale valine-NH₂ in de β -keten zou kunnen optreden, valt af te leiden uit (zij het geringe*) 5-hydroxymethylfurfural-vorming als de T.B.A.-test wordt toegepast op chromatografisch verkregen HbA₀ (14).

Verder blijkt dat, als haemoglobine wordt geïncubeerd met ¹⁴C-gelabeld glucose, er bij chromatografie daarna een zeer grote* hoeveelheid van het radioactieve label wordt teruggevonden in de HbA₀-fractie (naast uiteraard een piek in de HbA_{1c}-fractie) (45). Zowel binnen de HbA_{1c}- als de HbA₀-fractie blijkt geglycosyleerd haemoglobine de Amadori-omlegging tot de keto-amine vorm te hebben ondergaan. Dit valt aan te tonen door HbA₀ te incuberen met

*De productiesnelheid van 5-hydroxymethylfurfural uit de glucosyl-lysine binding is bij gelijke omstandigheden geringer dan die uit de glucosyl-valine binding (zie ook onder 2.2.4).

een mengsel van ^{14}C -gelabeld glucose en aan het tweede koolstofatoom getritieerd glucose. Na chromatografie blijkt noch in het (nieuw gevormde) HbA_{1c} , noch in het HbA_0 het getritieerde label terug te vinden (84, 14). Dit is compatibel met het verlies van het H^+ -ion aan het tweede koolstofatoom, dat optreedt bij de vorming van een keto-amine uit een Schiff-base (cf. figuur 1.1). Daarnaast moge de aanwezigheid van geglucosyleerd haemoglobine in keto-amine vorm binnen de HbA_0 -fractie ook blijken uit 5-hydroxymethylfurfural-vorming bij de T.B.A.-test op HbA_0 , waar bekend is dat deze test zeer specifiek is voor keto-amineverbindingen. Middels autoradiografie in combinatie met tweedimensionale 'peptide mapping' kan worden aangetoond dat glucosylatie plaatsvindt aan het terminale valine- NH_2 in de β -keten (waarna HbA_{1c} ontstaat), doch ook aan de 5-aminogroep van lysine, zowel in de α - als in de β -keten, en aan de terminale NH_2 -groep in de α -keten (84, 14). Naar schatting is bij een gezonde persoon ongeveer 10% van het HbA_0 op deze wijze geglucosyleerd.

1.5 Relatie van de percentuele hoeveelheid geglucosyleerd haemoglobine met de regeling van diabetes mellitus; literatuurgegevens.

Aangezien de glucosylatie van haemoglobine gezien kan worden als resultante van de hoogte van de glucosespiegel, waaraan haemoglobine wordt blootgesteld, en de duur van die blootstelling, zal bij een niet-optimaal geregelde patiënt met diabetes mellitus een verhoogd uitvallende $\text{HbA}_{1(c)}$ -spiegel verwacht kunnen worden. Tevens zou een $\text{HbA}_{1(c)}$ -spiegel informatie kunnen verstrekken over de mate van ontregeling van een diabeet. Er bestaan veel literatuurgegevens over de correlatie van HbA_1 , c.q. HbA_{1c} , c.q. geglucosyleerd haemoglobine bepaald met behulp van de T.B.A.-test, met de gebruikelijke parameters ter controle van de diabetesregulatie of met glucosewaarden, gevonden bij het verrichten van een orale glucose-tolerantie-test (O.G.T.T.). Deze gegevens zijn voor een deel moeilijk onderling te vergelijken door verschillen in laboratoriummethoden. Daarnaast is nogal eens het onderzochte patiëntenmateriaal niet nauwkeurig, of onderling sterk verschillend gedefinieerd. Daar de gegevens uit de literatuur door deze pluriformiteit van selectie in patiëntenmateriaal moeilijk onderling vergelijkbaar zijn, en de gevonden waarden aan geglucosyleerd haemoglobine slechts per onderzoek van betekenis zijn, is hieronder volstaan met het weergeven van de trend van de verschillende conclusies. Hierbij zal steeds worden gesproken over gsHb als afkorting van geglucosyleerd haemoglobine, ongeacht of nu in het individuele geval de fractie van geglucosyleerd haemoglobine bepaald is met behulp van macrokolomchromatografie, high-pressure liquid chromatography, iso-electrofocusing of middels de T.B.A.-test.

De gegevens zijn zoveel als mogelijk gerangschikt naar de aard van het patiëntenmateriaal, dat werd onderzocht.

1.5.1 gsHb Bij patiënten met 'chemische' diabetes mellitus.

De literatuur is eenstemmig in haar mening dat individuele patiënten uit deze groep door middel van bepaling van het gsHb-gehalte niet van normalen te onderscheiden zijn. Wel wordt soms de gemiddelde waarde van de groep significant verschillend gevonden ten opzichte van normaal (36), – er is dan echter wel een groot overlappingsgebied van de gsHb-waarden van deze patiënten met die van de controlegroep. Anderen bereiken de bovenvermelde significantie niet (44, 79).

1.5.2 gsHb Bij patiënten met diabetes mellitus, behandeld met uitsluitend een dieet, of met een dieet in combinatie met orale antidiabetica (N.I.D.D.M. – non-insulin dependent diabetes mellitus).

Bij deze groep patiënten wordt gewoonlijk een goede correlatie gevonden tussen gsHb-spiegels en mate van glucosurie, nuchtere serumglucose-waarden (68, 53, 8) en post-prandiale serumglucosewaarden (19). Bij deze patiënten met insuline-onafhankelijke diabetes mellitus blijkt tevens een correlatie te bestaan tussen het gsHb en de som van de serumglucose-waarden op 0, 1, 2 en 3 uur afgenomen na het begin van een orale glucose-tolerantie test.

Bij patiënten met N.I.D.D.M. blijken de postprandiale insulinespiegels, die zoals te verwachten correleren met de gewichtsindex, niet te correleren met de serumglucose-waarden of gsHb-spiegels (19). Binnen de hier besproken groep patiënten blijkt dat gedeelte, dat slechts met een dieet wordt behandeld, lagere gsHb-waarden te hebben dan het gedeelte, dat tevens met orale antidiabetica wordt behandeld. Dunn (39) vindt bij de groep diabeten, die alleen met dieet wordt behandeld, voor 39% 'normale' waarden; bij een groep, die tevens met orale antidiabetica wordt behandeld slechts voor 10%. Gonen (52) vindt voor deze eerste groep dat 70% van de gsHb-waarden lager zijn dan 10%, terwijl dit voor de tweede groep 26% bedraagt (als bovenste grens voor de normaalwaarde van gsHb geeft hij 8,3% aan).

Uiteraard zijn deze gegevens slechts van zeer relatieve waarde, en onder meerdere sterk afhankelijk van de wijze, waarop men patiënten met overgewicht-diabetes behandelt.

1.5.3 gsHb Bij met insuline behandelde patiënten met diabetes mellitus (I.D.D.M. – insulin dependent diabetes mellitus).

Bij de insuline-afhankelijke diabeten worden volgens de literatuur, in vergelijking met de insuline-onafhankelijke diabeten, hogere gsHb-waarden gevonden. In de bovenvermelde studies vindt Gonen (52) voor deze groep slechts 13% aan gsHb-waarden, lager dan 10%, terwijl Dunn (39) géén waarden binnen het normaalgebied aangeeft.

Ten aanzien van de correlatie tussen gsHb-spiegels en klinische parameters voor controle op de regeling van diabetes mellitus, worden verschillende waar-

nemingen gedaan. Gabbay (49) vindt bij insuline-afhankelijke diabetes een correlatie-coëfficiënt van 0,57 bij vergelijking van een gsHb-spiegel met de mate van glucosurie, die ongeveer twee maanden voor afname van die spiegel bestond. Gonen (52) vindt een positieve correlatie tussen nuchtere serumglucose-waarden en gsHb bij met insuline behandelde diabetes, bij wie de diabetes werd vastgesteld na het twintigste levensjaar; er bestond géén correlatie bij een groep insuline-afhankelijke diabetes, bij wie de diagnose vóór het twintigste levensjaar werd gesteld. Het ontbreken van een correlatie bij deze laatste groep wordt door de schrijver geweten aan de labiele regeling, die bij deze diabetes bestond. Jos et al. (59) vinden bij insuline-afhankelijke diabetes een correlatie-coëfficiënt van 0,69 ten aanzien van de nuchtere serumglucose-waarden, en van 0,65 ten aanzien van de glucosurie gedurende 24 hr. ten opzichte van de gevonden gsHb-waarden.

Door Chiumello c.s. werd in 1979 melding gedaan van het totaal ontbreken van enige correlatie tussen gsHb-bepalingen en serumglucosewaarden en mate aan glucosurie bij een groep met insuline behandelde kinderen met diabetes mellitus (20).

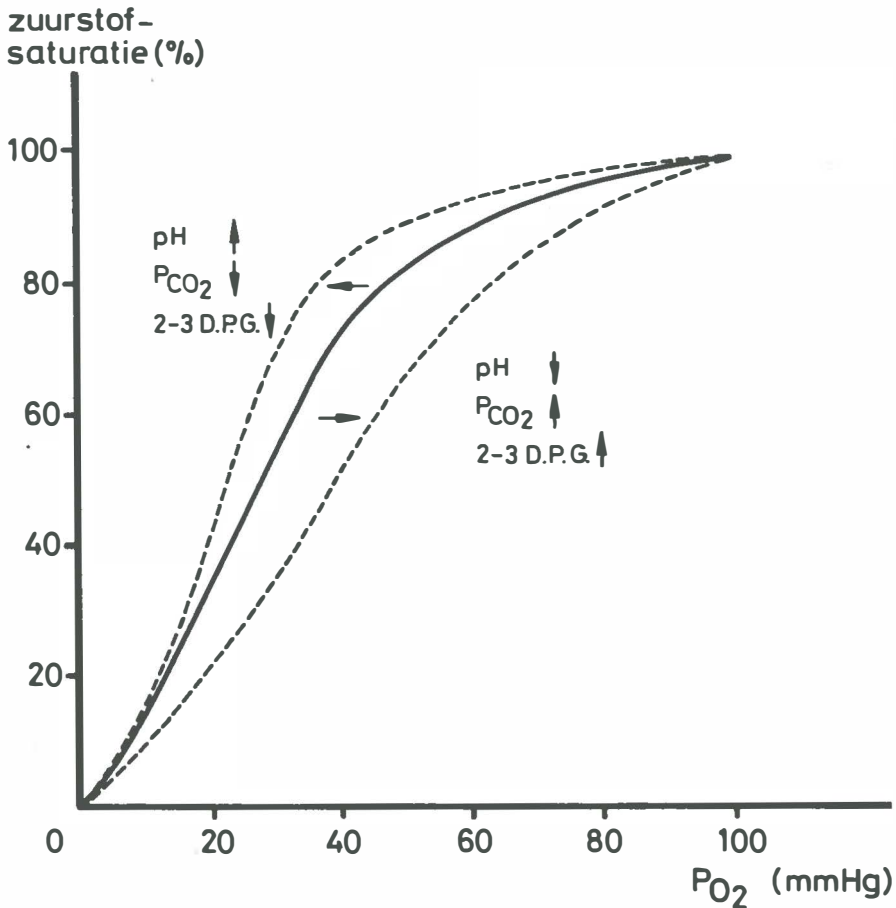
1.5.4 Bepaling van gsHb als diagnosticum voor diabetes mellitus.

Een verhoogde gsHb-spiegel bij een individu zal waarschijnlijk uiting zijn van het bestaan van een gestoorde glucose-tolerantie (– als uitzondering op deze regel de situatie, waarin recent de aanmaaksnelheid van erythrocyten is gered (10, 86)).

Op grond hiervan adviseren sommigen (39) tot bepaling van gsHb als screeningsmethode voor diabetes mellitus, omdat, in vergelijking met het verrichten van een O.G.T.T., voorafgaande aan afname geen speciale maatregelen noodzakelijk zijn, en de belasting voor de patiënt geringer is. Niet een ieder met een gestoorde glucose-tolerantie heeft echter een verhoogde gsHb-spiegel (79, 36). Daar bij gebruik van een gsHb-spiegel als screeningsmethode dus een groep patiënten met licht gestoorde glucose-tolerantie onopgemerkt zal blijven, wordt door anderen (66, 44) sterk tegen deze procedure gepleit.

1.6 Effect van glucosylatie op de functie van het haemoglobine.

Bij de glucosylatie van haemoglobine wordt, afhankelijk van de mate van regeling van de diabetes, in mindere of meerdere mate aan de eindstandige NH_2 -groep in de β -ketens een suiker gebonden. De positie van de zuurstof-dissociatie curve (oxygen dissociation curve – O.D.C.) wordt bepaald door de pH, de temperatuur en de hoeveelheid in de erythrocyt aanwezige 2,3-difosfoglyceraat (2,3-DPG) (18) (zie figuur 1.3); bij hogere 2,3-DPG-spiegels verschuift de O.D.C. naar rechts, waardoor de P_{50} toeneemt en dus de zuurstofaffiniteit afneemt. Bij hypoxaemische stress bij normalen ontstaat zo na aanmaak van 2,3-DPG (– door glucolyse en bij verbruik van anorganisch fosfaat) een afgenomen zuurstofaffiniteit van het haemoglobine, waardoor een grotere zuurstof-afgifte aan de weefsels mogelijk is.



Figuur 1.3
De invloed van de pH, P_{CO_2} en 2,3-D.P.G. op de zuurstofdissociatiecurve van oxyhaemoglobine

Het 2,3-DPG bindt aan het haemoglobine aan β -143-his en aan de terminale NH_2 -groep in de β -ketens. Bij de geglycosyleerde haemoglobineproducten is deze laatste plaats geblokkeerd door de aanwezigheid van een suiker. Hierdoor kan 2,3-DPG zich niet aan de HbA_1 -fractie binden. Het HbA_{1c} blijkt dan ook een hoge zuurstof-affiniteit te bezitten; Bunn en Briehl (11) toonden aan dat de zuurstof-affiniteit van HbA_{1c} slechts in geringe mate wordt beïnvloed door toevoeging van 2,3-DPG, in tegenstelling tot die van het HbA_0 . Als compensatiemechanisme wordt bij niet-ontregelde diabetes in de basale situatie een hoge spiegel aan 2,3-DPG aangetroffen (5, 34), waardoor de zuurstof-affiniteit van het HbA_0 geringer is. De P_{50} van het totaal haemoglobine is daardoor ongeveer gelijk aan die van normalen.

Daarnaast is bij diabetes mellitus een adaptatie aanwezig aan dreigende weefselhypoxie in de zin van een verhoogde haemoglobineconcentratie en een uitgesproken dilatatie van het microvasculaire systeem (31). Deze voor de aanwezigheid van een haemoglobine met hoge zuurstof-affiniteit gecompenseerde situatie wordt doorbroken bij ontregeling van de diabetes mellitus. Tijdens een keto-acidotische ontregeling ontstaat bij lage pH-waarden een remming van de enzymen DPG-mutase en fosfofructokinase, en daardoor een afname van de vorming van 2,3-DPG. Na behandeling met insuline ontstaat een flux van anorganisch fosfaat (met glucose) in de richting van spier- en vetweefsel, waardoor de concentratie ervan in de erythrocyt sterk afneemt (25). Daarnaast zijn de fosfaatreserves in deze situatie meestal al afgenomen door eerder opgetreden verlies in de urine bij de glucosurie. De afname van anorganisch fosfaat in de erythrocyt draagt verder bij tot een afname van de 2,3-DPG-spiegel (32). De plasmafosfaatspiegel kan na correctie van de ontregeling gedurende een week subnormaal blijven. De P_{50} van de O.D.C. blijkt bij keto-acidotische ontregeling initieel nog normaal – op basis van het Bohr-effect op de positie van de O.D.C., compenserend voor de lage 2,3-DPG-spiegels (cf. figuur 1.3).

Na correctie van de acidose ontstaat een sterke verschuiving van de O.D.C. naar links. Parallel aan de normalisatie van de spiegels van anorganisch fosfaat normaliseert de P_{50} eerst na 6 tot 8 dagen (3, 30).

Gedurende deze periode bestaat er een sterke weefselhypoxie, zoals blijkt uit de toegenomen veneuze zuurstofspanning en zuurstofverzadiging, die bij de diabeet na keto-acidotische ontregeling wordt gevonden, en die na herstel van de acidose slechts langzaam normaliseert (29).

Ook bij de ontregelde diabeet zonder keto-acidose is mogelijk sprake van frequente perioden met weefselhypoxie. Bij slecht geregelde diabetes fluctueren de spiegels van anorganisch fosfaat, waardoor de modulatie van 2,3-DPG op de positie van O.D.C. als compensatie voor de aanwezigheid van verhoogde HbA₁-spiegels vaak onvoldoende is (33, 90). Zelfs de gebruikelijke dagelijkse insuline-toediening bij diabetes blijkt het 2,3-DPG-gehalte en daarmee de P_{50} te doen afnemen gedurende 3 tot 4 uur na elke injectie (35). De summatie van de veelvuldige perioden met geringe weefselhypoxie en enkele perioden met ernstige weefselhypoxie zou over jaren een rol kunnen spelen bij het ontstaan van de diabetische micro-angiopathie (33).

1.7 Glucosylatie van eiwitten, anders dan haemoglobine; mogelijke relatie met het ontstaan van late complicaties bij diabetes mellitus.

1.7.1 Glucosylatie van serum-albumine.

Er is niet a priori een reden te noemen, waarom glucosylatie uniek zou zijn voor het haemoglobine-molecuul. Van deze stelling uitgaande gelukte het Day et al. (26) aan te tonen, dat humaan serum-albumine in vitro te glucosyleren is.

Geglucosyleerd albumine wordt, na zuivering, bepaald volgens de T.B.A.-me-

thode (thiobarbituurzuur-methode). De glucosylatie van albumine geschiedt met name (voor 90%) aan het lysine, en blijkt, via vorming van een Schiff-base, een stabiele keto-amine structuur te leveren (27).

Geglucosyleerd albumine is in verhoogde mate aanwezig bij diabetische ratten (27) en bij de diabetische mens (42). De hoeveelheid geglucosyleerd albumine blijkt gerelateerd aan de ernst van de hyperglycaemie (42). Daar de halfwaardetijd van humaan serum-albumine ongeveer 20 dagen bedraagt, zal de mate van glucosylatie van het albumine bij een diabeet de resultante zijn van de ernst van de perioden met hyperglycaemie gedurende een korter tijdsbestek dan vergeleken met de gsHb-spiegel (waarbij ten aanzien van de vorming van dit laatste de gemiddelde levensduur van een erythrocyt van ongeveer 120 dagen geldt). Na snelle correctie van een ontregeling bij een diabeet zet na 4 tot 7 dagen de daling van de geglucosyleerde fractie van het serum-albumine in (101).

1.7.2 Mogelijke relatie van glucosylatie van eiwitten en het ontstaan van late complicaties bij diabetes mellitus.

Glucosylatie beperkt zich niet slechts tot haemoglobine en albumine, doch kan in principe bij alle lichaamseiwitten voorkomen (102). De late complicaties bij diabetes mellitus worden met name in die weefsels aangetroffen, die van insuline onafhankelijk zijn (89). Bij hyperglycaemie bestaat in de cellen van deze weefsels een hoge glucose-concentratie, die aanleiding zou kunnen zijn tot versterkte glucosylatie van celeiwitten. Glucosylatie van belangrijke eiwitten zou tot wijziging van hun functie kunnen leiden, en op deze wijze de cellulaire afwijkingen, die bij diabetes worden gezien, kunnen veroorzaken.

Een belangrijk voorbeeld van een cel, die ten aanzien van de intracellulaire glucoseconcentratie onafhankelijk is van insuline, is de *erythrocyt*. Ontregeling van diabetes mellitus leidt tot versterkte glucosylatie van een belangrijk celeiwit, het haemoglobine. De aanwezigheid van een hoog percentage aan geglucosyleerd haemoglobine leidt tot een zekere mate van verlies van de functie van de erythrocyt, het zuurstoftransport (vide supra).

Er zijn tevens aanwijzingen dat de lysine- ϵ -aminogroepen van *de eiwitten van de erythrocytenmembraan* glucosylatie ondergaan (73). Deze modificatie zou eveneens functionele betekenis kunnen hebben. Peterson et al. (76) toonden aan dat de halfwaardetijd van de erythrocytenoverleving, bepaald door middel van ^{51}Cr -labeling, bij slecht geregelde diabetes matig verkort is; deze verkorting blijkt reversibel na correctie van de ontregeling. Mc. Millan et al. (72) hebben aangetoond dat de vervormbaarheid van diabetische erythrocyten is afgenomen ten opzichte van normaal; of glucosylatie van membraaneiwitten hierbij een rol speelt, is echter nog onbekend.

De ooglens is eveneens ten aanzien van de glucoseconcentratie van insuline onafhankelijk. Bij een ontregeling van de diabetes mellitus wordt in vivo in de lens een verhoogde glucoseconcentratie aangetroffen. In vitro is aangetoond, dat hierbij een toegenomen glucosylatie van de ϵ -aminogroep van het lysine in het kristaleiwit bestaat. Hierdoor ontstaat een toegenomen bereidheid van het

kristaleiwit tot vorming van disulfidebruggen, ten gevolge waarvan aggregaten worden gevormd met een hoog molecuulgewicht. In vitro vertoont het kristaleiwit in oplossing hierbij een toegenomen opalescentie (17, 92). Het ontstaan van cataract bij diabetes mellitus zou hiermee deels verklaard kunnen worden. Hierbij sluit aan, dat bij alloxaan-diabetische ratten, en ook in de ooglen van de humane diabeet met een cataract een, ten opzichte van niet-diabetische contrôles, verhoogde fractie aan geglycosyleerde ϵ -aminogroepen van het lysine van het kristaleiwit wordt gevonden.

Een relatie tussen glycosylatie van eiwitten en het ontstaan van de afwijkingen in *de nieren* lijkt ook aanwezig. Het pathofysiologisch mechanisme zou dan kunnen berusten op een indirect effect op de nieren (beschadigend effect door geglycosyleerde serum-eiwitten) of door glycosylatie van glomerulaire eiwitten. Lubec et al. (69) vinden in urine van diabeten bij immuno-electroforese van glomerulair basaalmembraan (G.B.M.) - antigeen een andere verplaatsingssnelheid dan bij niet-diabeten. Wijziging van de G.B.M. door glycosylatie zou hiervoor een verklaring kunnen geven. Deze hypothese wordt ondersteund door de waarnemingen van Beisswenger en Spiro (7), die een toename van het gehalte aan glycosyl-galactosyl-disacchariden in de G.B.M. bij diabeten beschrijven; het is echter in tegenspraak met de bevindingen van Sato et al. (80), die in de G.B.M. van bij autopsie verkregen nieren van diabeten een ten opzichte van normaal afgenomen hoeveelheid glucose meten.

Voor een beschadigend effect van geglycosyleerde serum-eiwitten op de G.B.M. pleit de studie van Mc. Verry et al. (97). Bij de diabetische glomerulopathie ontstaat een verdikking van de G.B.M., waarbij deze een moth-eaten aspect heeft of vacuolen vertoont. Daarnaast bestaan veranderingen in het mesangium. Bij niet-diabetische muizen werden deze voor diabetes mellitus karakteristieke afwijkingen in de G.B.M. gevonden nadat zij gedurende 12 weken een aantal intraveneuze injecties van in vitro geglycosyleerde plasma-eiwitten toegediend kregen. Bij een contrôle-groep, die dezelfde plasma-eiwitten toegediend kreeg, zonder dat deze vooraf geglycosyleerd werden, ontstonden deze afwijkingen niet (97).

Tenslotte kan worden gespeculeerd of de stoornissen van *het periphere zenuwstelsel*, die bij diabetes mellitus worden gevonden, voor een deel te verklaren zouden kunnen zijn door glycosylatie. Grondslag hiervoor is de pathologisch-anatomische overeenkomst van de diabetische neuropathie met de cyanaat-neuropathie. Cyanaat reageert in vivo en in vitro met dezelfde terminale valine aminozuurgroep van het haemoglobine als glucose. Toegevoegd aan lenskristal-eiwitten veroorzaakt het eveneens cataract (16, 63).

Voorzover glycosylatie een rol speelt bij het ontstaan van de late complicaties bij diabetes, zal de percentuele hoeveelheid van de gemodificeerde eiwitten, die aan het pathofysiologisch mechanisme hiervan ten grondslag ligt, bepaald worden door de snelheid van vorming, de reversibiliteit van de reactie en de halfwaardetijd van de levensduur van het betreffende eiwit. Dit impliceert het in principe reversibele karakter van deze afwijkingen, mits een duurzame, adequate regeling van de diabetes bereikt kan worden.

Hoofdstuk 2

LABORATORIUMBEPALINGEN EN STATISTISCHE BEWERKING

2.1 *De thiobarbituurzuurreactie.*

2.1.1 *Principe.*

Koolhydraten verliezen bij verhitting met zwakke organische zuren water, waarbij ringvormige onverzadigde verbindingen ontstaan. Deze verbindingen reageren, afhankelijk van de hun nog resterende functionele groepen, met chromogenen als orcinol en thiobarbituurzuur, waardoor colorimetrie mogelijk wordt. Hexosen in furanose-vorm kunnen 5-hydroxymethylfurfural (HMF) leveren, dat condenseert met thiobarbituurzuur en daarna te meten is bij 443 nm. Zo levert fructose na verhitting met 0,3 N oxaalzuur wel HMF, doch glucose niet. Ook in sucrose gebonden fructose levert HMF (fig. 2.1). Aldo-hexosen die aan eiwit gebonden zijn en, na Amadori-omlegging, daarbij in furanosevorm zijn, dehydrateren eveneens (zie fig. 1.1). Afsplitsing van het gevormde furanderivaat levert HMF.

De meest waarschijnlijke opeenvolging van reacties is weergegeven in figuur 2.2.

2.2 *Bepaling van geglucosyleerd Hb. door middel van de T.B.A.-test.*

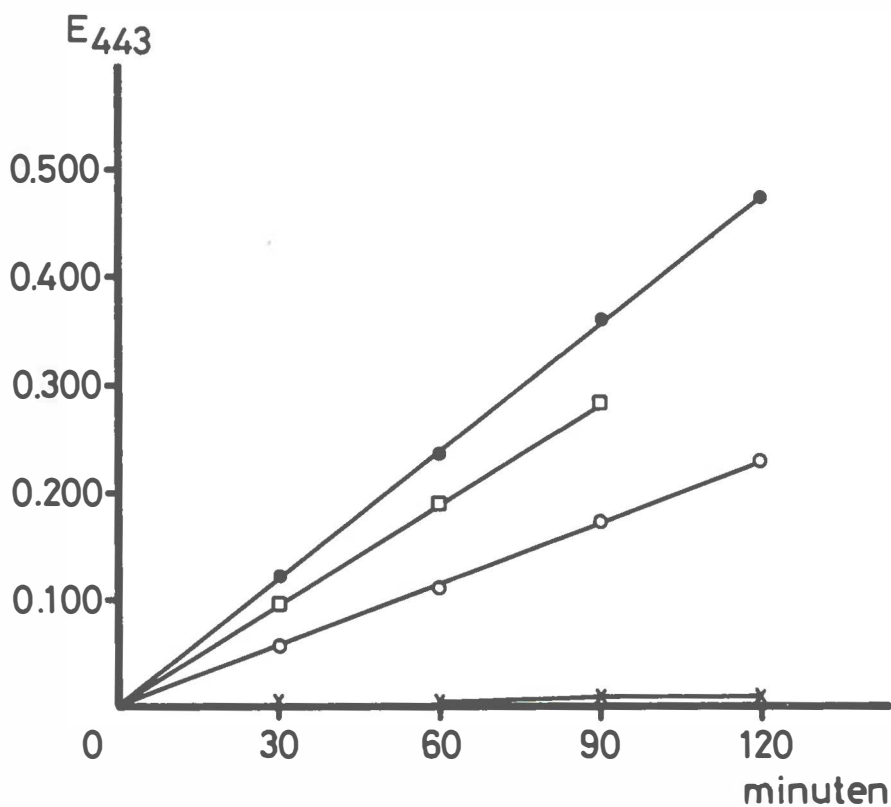
2.2.1 *Uitvoering.*

2.2.1.1 *Haemolysaat.*

Voordat de thiobarbituurzuurreactie kan worden uitgevoerd op haemoglobine, dienen erythrocyten te worden gelyseerd. Gekozen werd voor de volgende methode.

1. 3 tot 5 ml. heparinebloed centrifugeren en het plasma afzuigen met behulp van een waterstraalpomp.
2. de cellen wassen met 5 ml. fysiologisch zout; supernatant na centrifugeren verwijderen met behulp van een waterstraalpomp.
3. 4 ml. aqua dest. en 1 ml. tetra toevoegen.
4. 3 minuten krachtig mixen op een reageerbuismixer.
5. 20 minuten centrifugeren.

Omdat er mogelijk door de verschillende dichtheid van de erythrocyten van verschillende leeftijd na centrifugeren een leeftijdsgradiënt ontstaat, werd nooit uit een bloedmonster een gedeelte van de erythrocyten gelyseerd, doch steeds alle cellen. Na bepaling van de haemoglobineconcentratie in het haemolysaat, werden porties van 1,0 ml. in glazen buizen bij -20°C opgeslagen. Tenzij anders vermeld, werd op deze porties de T.B.A.-reactie uitgevoerd.



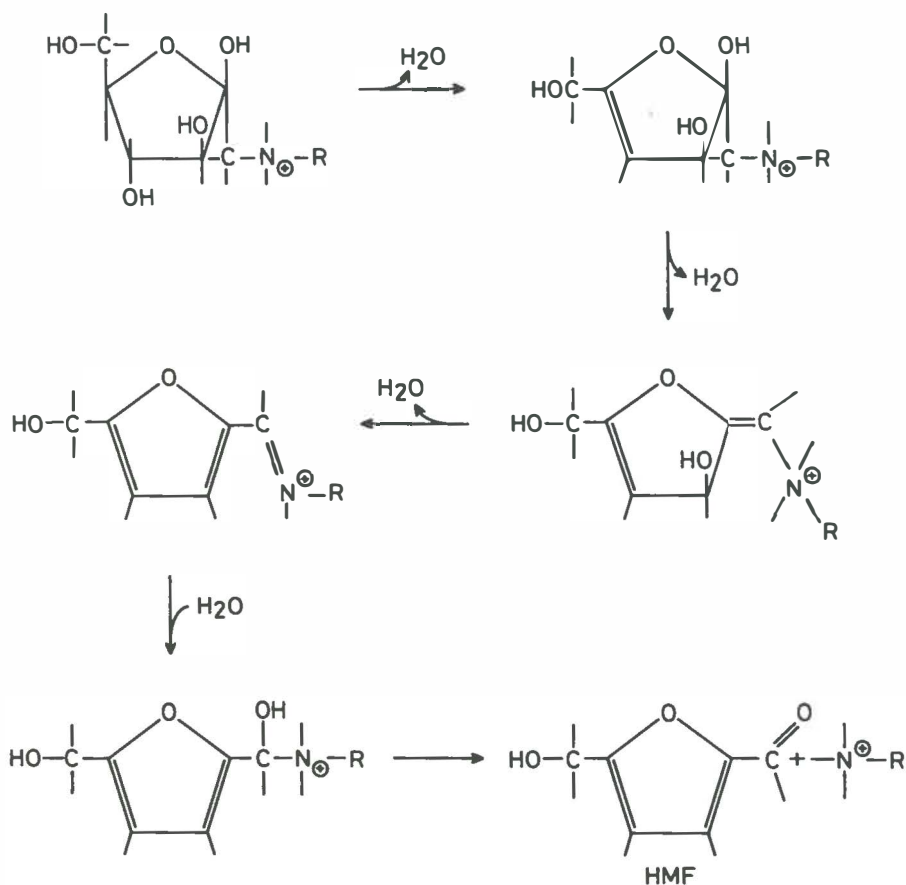
Figuur 2.1

Kleuopbrengst met 0,3 N oxaalzuur uitgezet tegen de reactietijd bij 100°C van

- 50 mg/100 ml fructose
- 50 mg/100 ml sucrose
- × 50 mg/100 ml glucose
- haemolysaat

2.2.1.2 Reagentia voor de T.B.A.-reactie op haemoglobine.

1. 0,3 N oxaalzuur in water (tenzij andere concentratie vermeld)
2. 40% trichloorazijnzuur (TCA) in water
3. 0,05 M thiobarbituurzuur (TBA) in water (oplossen bij 40°C; is oververzadigd).



Figuur 2.2

Waarschijnlijk reactieschema van de productie van 5-hydroxymethylfurfural (HMF) door verhitting met zuur van de keto-amine verbinding van geglycosyleerd eiwit

2.2.1.3 Opzet van de gsHb-bepaling volgens de T.B.A.-methode.

De haemolysaatfractie wordt met oxaalzuur gemengd en in een kokend-water bad verhit, waarbij de buizen zijn afgedekt door middel van een glazen knikker. Na snelle afkoeling in stromend kraanwater wordt TCA toegevoegd en direct goed gemengd. Na centrifugeren wordt het supernatant overgebracht in een glazen buis en TBA toegevoegd. Na mengen wordt dit gedurende 40 minuten geïncubeerd bij 40°C .

De extinctie wordt gemeten op een spectrofotometer bij 443 nm. De kleur is minstens 3 uur stabiel.

2.2.1.4 Bepalingsvoorschrift.

In duplo:

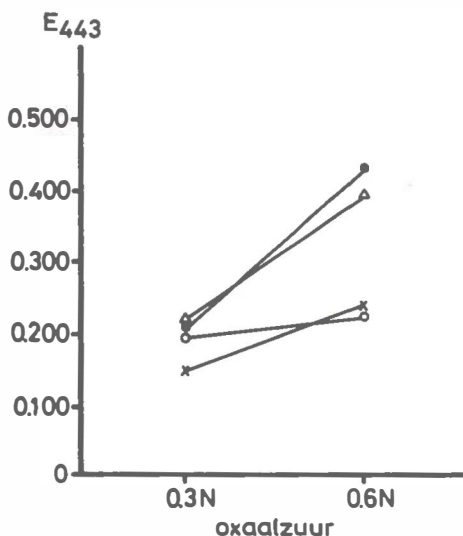
1. 1,0 ml. haemolysaat met 0,5 ml. 0,3 N oxaalzuur gedurende 60 minuten verhitten bij 100°C.
2. Na koeling onteiwitten met 0,5 ml. 40% TCA.
3. 1,0 ml. supernatant kleuren met 0,25 ml. 0,05 M TBA.
4. Meten bij 443 nm. tegen een blanco (1,0 ml. water in plaats van haemolysaat).
5. Eventueel corrigeren m.b.v. 2 contrôle-haemolysaten (concentraties ongeveer 6% en 12% HbA₁).

N.B. 1 Vooraf werd bepaald of de haemoglobineconcentratie in het haemolysaat ligt tussen 50 en 150 g/l. (zie 2.2.3).

N.B. 2 Voor de gekozen tijden en concentraties in het bovenstaande voorschrift, zie onder 2.2.2 en 2.2.3.

2.2.2 De reactietijd.

De productiesnelheid van HMF uit geglycosyleerd haemoglobine is gedurende zeker een uur constant; zie figuur 2.1. Exacte timing is daardoor noodzakelijk. Voor geringe verschillen in opwarmtijd en afkoelingstijd kan worden gecorrigeerd met behulp van contrôle-haemolysaten. In overeenstemming met de literatuur (78) is gekozen voor een gehaltebepaling, gebaseerd op de kleur-opbrengst in één uur.

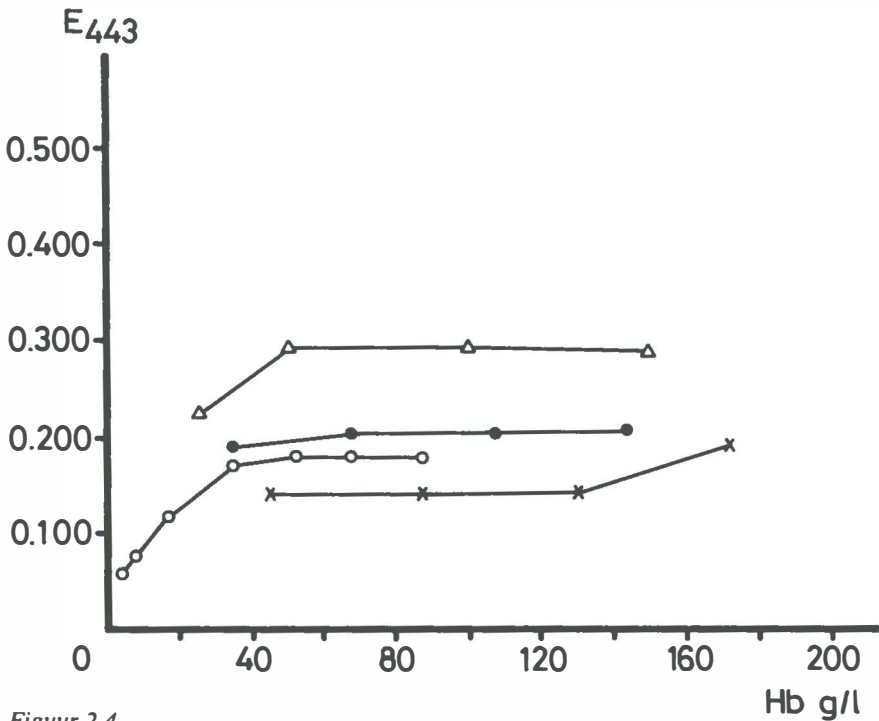


Figuur 2.3

Kleuropbrengst in verschillende haemolysaten, afhankelijk van de oxalaalzuurconcentratie

2.2.3 De pH-afhankelijkheid.

Aangezien de reactie pH-afhankelijk is (figuur 2.3) en het haemoglobine een sterke bufferwerking heeft, werd oorspronkelijk (45) de haemoglobineconcentratie constant op 100 g/l gehouden. Bij toepassing van oxaalzuur in een concentratie van 0,3 N blijkt echter de kleuropbrengst over een groot traject van de haemoglobineconcentratie in het haemolysaat constant (figuur 2.4). Bij



Figuur 2.4

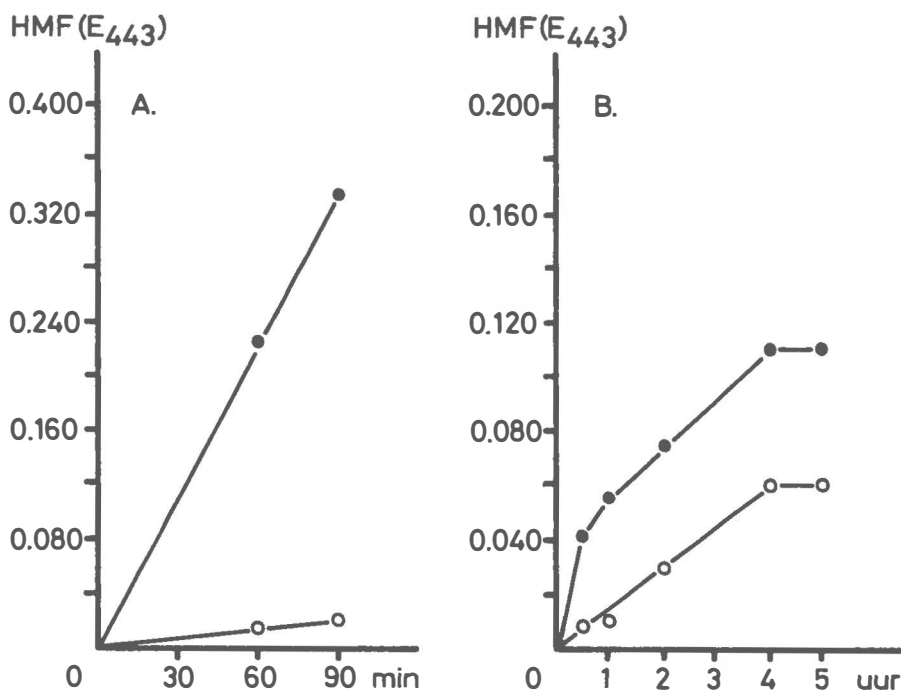
Kleuropbrengst bij gebruik van 0,3 N oxaalzuur in 4 verschillende bloedmonsters, uitgezet tegen de haemoglobineconcentratie in het haemolysaat

haemoglobineconcentraties in het haemolysaat tussen 50 en 150 g/l is de kleuropbrengst daarom niet een functie van de *concentratie* geglycosyleerd haemoglobine, doch van de *fractie* geglycosyleerd haemoglobine. Daarom werd afgezien van de standaardisatie tot 100 g/l van de haemoglobineconcentratie in het haemolysaat.

2.2.4 De productiesnelheid van HMF uit terminale en intra-chain glucosylering.

Aangezien de productiesnelheid van HMF waarschijnlijk afhankelijk is van de

pK-waarde van de amino-groep, waaraan de hexose is gebonden, werd nagegaan in hoeverre bij gebruik van 0,3 N oxaalzuur de intra-chain glucosylering van haemoglobine bijdraagt aan de HMF-opbrengst. Daartoe werd op haemoglobine een TBA-reactie uitgevoerd met 0,3 N oxaalzuur; dit werd vergeleken met een TBA-reactie, waarbij 1,0 M oxaalzuur werd gebruikt. Bekend is dat met 1,0 M oxaalzuur en een eiwitconcentratie van ongeveer 50 g/l de HMF-opbrengst compleet is na 4½ uur. Te verwachten was dat de kleuropbrengst bij 1,0 M oxaalzuur initieel zeer groot is (door de snelle HMF-productie uit de terminale glucosylering) en daarna geleidelijk zou toenemen (door de langzame HMF-productie uit de intra-chain glucosylering). Ter vergelijking werd de kleuropbrengst vervolgd bij gelijke concentraties runder-serumalbumine, dat ongeveer voor 10% geglucosyleerd is, echter uitsluitend op intra-chain localisaties. Zoals uit figuur 2.5 blijkt, is de HMF-opbrengst uit intra-chain glucosylering gering bij gebruik van 0,3 N oxaalzuur. Op deze wijze uitgevoerd, zal de bepaling goed overeenkomen met HbA₁-bepalingen volgens andere principes, zoals bekend is uit de literatuur (78, 50).



Figuur 2.5

HMF-productie, uitgezet tegen de reactietijd bij 100°C

A eiwitconcentratie 100 g/l; 0,3 N oxaalzuur

B eiwitconcentratie 5 g/l; 1,0 M oxaalzuur

• haemoglobine in haemolysaat

○ runder-serumalbumine

Zo komen extincties van 0,166 en 0,291 overeen met percentages HbA_1 van respectievelijk 5 en 10% (78).

2.2.5 *gsHb-waarden Bij normalen.*

Bij 25 gezonde volwassenen werd het gsHb-gehalte bepaald. De waarden varieerden van 0,192 tot 0,253 met een gemiddelde van 0,217 en een standaarddeviatie van 0,016 (overeenkomend met resp. 6,0 tot 8,5% en 7,0%, 0,64%).

2.2.6 *Variabiliteit van de bepaling.*

Uitgevoerd in 20-voud varieerde de intra-assay variatie-coëfficiënt tussen 2,0% bij een gsHb-opbrengst van 0,180 tot 3,6% bij een opbrengst van 0,360. De inter-assay variatiecoëfficiënt (in 10-voud) varieerde van 5,5% bij een opbrengst van 0,180 tot 7,5% bij een opbrengst van 0,360 zonder correctie. Met correctie met behulp van controle-monsters bedroegen deze waarden respectievelijk 3,5% en 4,8%.

Monsters van één patiënt werden zoveel als mogelijk bepaald in één assay-run.

2.3 *Bepaling van haemoglobine gehalte, bloedglucose, C-peptide- en insuline-spiegels.*

Het haemoglobine gehalte van het bloed werd bepaald volgens de cyaan-haemiglobine methode.

De bloedsuikermeting gebeurde in duplo, volgens de ferricyanide methode op een auto-analyzer.

De quantificering van glucose in urine geschiedde polarimetrisch.

Insuline en C-peptide werden radio-immunologisch bepaald (103).

2.4 *Statistische bewerking.*

Voor vergelijking van groepen werd gebruik gemaakt van de Wilcoxon-toets voor gepaarde of ongepaarde waarnemingen (tweezijdig).

Voor beoordeling van correlaties werd gebruik gemaakt van de Spearman rank test.

Getoetst werd op een significantie van 5%.

Hoofdstuk 3

VRAAGSTELLING; PATIENTEN EN METHODEN

3.1 *Vraagstelling.*

De laatste jaren ontstaat steeds meer grond voor de juistheid van de stelling, dat een betere mate aan regeling gepaard gaat met een afname van de kans op late complicaties bij diabetes mellitus. In verband hiermede is de behoefte een parameter in handen te hebben, die informeert over de kwaliteit van diabetes-regulatie, toegenomen. De tot op heden gebruikelijke parameters voor diabetes-regulatie (nuchtere serum glucose-waarde, concentratie van glucose in urine, eventueel in vier porties, verzameld op een verschillend moment van de dag) geven enerzijds slechts een momentopname, anderzijds in bepaalde situaties (bijvoorbeeld bij gestoorde nierfunctie), een onjuiste indruk omtrent het resultaat van de behandeling van de diabetes-patiënt. Met de ontwikkeling van de bepaling van de geglucosylde fractie van het haemoglobine zijn een aantal vragen omtrent de klinische waarde hiervan ontstaan:

- a. Geeft deze parameter een indruk over het resultaat van de behandeling van de diabetes mellitus?
- b. Verschilt de eventuele relatie tussen deze en andere parameters voor diabetes-regulatie, afhankelijk van de groep van diabeten, waarbij deze bepaling wordt verricht?
- c. Is bepaling van deze parameter van concreet belang voor de behandeling van de diabetes?
- d. Over bij benadering welke periode informeert deze parameter over de mate van regulering van de diabetes mellitus?

3.2 *Patiënten en proefopzet.*

In het onderzoek werden 29 patiënten met diabetes mellitus opgenomen. Van deze patiënten werden 9 behandeld met slechts een dieet, of met een dieet in combinatie met orale antidiabetica (groep A), en 20 behandeld met een dieet in combinatie met insuline-substitutie (groep B).

De leeftijd in groep A varieerde van 33 tot 73 jaar, met een mediaan van 68, en in groep B van 18 tot 77 jaar met een mediaan van 33. Het lichaamsgewicht als percentage van telkenmale het voor de betreffende patiënt geldende normale gewicht (21) varieerde in groep A van 124 tot 94 met een gemiddelde van 106,8, en in groep B van 112 tot 83 met een gemiddelde van 96,7. De insuline-substitutie in groep B varieerde van 24 tot 80 E insuline per dag; 10 patiënten gebruikten 40 E insuline per dag of minder, 10 gebruikten meer dan 40 E per dag.

De gegevens van elke individuele patiënt worden weergegeven in Appendix A. De waarnemingen bij alle bovengenoemde patiënten geschieden poliklinisch.

Groep A en B. Bij opneming in de studie werd bij patiënten uit deze groepen, teneinde een indruk te krijgen over de insuline-reserve, een glucagontest verricht volgens de methode van Faber en Binder (41), waarbij de afnametijden werden gewijzigd. Hierbij werd in nuchtere situatie 1 mg. glucagon intraveneus toegediend, waarbij afname van bloedmonsters op -5, 0, 5 en 10 minuten. In deze monsters werden bepaald:

C-peptide,

Insuline (bij patiënten, die niet met insuline werden behandeld),

bloed-glucose,

in één monster: gsHb.

De patiënten verschenen daarna als gewoonlijk op de diabetespolikliniek voor het 'reguleren' van de diabetes mellitus. De tussenpozen tussen de verschillende revisie-afspraken werden bepaald door de klinische situatie. Bij elke revisie, waarbij alle patiënten nuchter verschenen, werden bepaald:

bloed-glucose, nuchter en 1 uur na het ontbijt,

glucosurie in 4 porties urine, verzameld gedurende het voorgaande etmaal, gsHb,

C-peptide,

insuline (bij diè patiënten waarbij geen insuline werd verstrekt).

Bij sommige patiënten werden tevens spiegels aan geglucoosyleerd albumine bepaald (zie hiervoor onder hoofdstuk 8).

Hoofdstuk 4

KLASSIEKE DIABETES-CONTROLE EN gsHb-WAARDEN

4.1 *Bewerking van de 'klassieke' parameters, verkregen bij de poliklinische contrôles.*

Zoals onder 3.2 reeds werd aangegeven, werden bij de poliklinische contrôles onder meer de nuchtere bloedglucose-waarde en de glucosurie gedurende de dag, voorafgaande aan die van polikliniekbezoek, bepaald. In dit hoofdstuk zullen deze 'klassieke' parameters voor diabetesregulatie onder meer worden vergeleken met gsHB-spiegels. Daar de behoefte bestaat niet alleen bloedglucose en glucosurie afzonderlijk, doch ook een totaal-indruk op basis van deze beide gegevens bij de vergelijkingen te gebruiken, is ervoor gekozen deze gegevens te 'vertalen' in een score (zie tabel 4.1). Zo wordt elk polikliniekbezoek

*Tabel 4.1
Diabetes-regeling score*

Score	nuchtere serum-glucose (mmol/l)	Score	glucosurie (mmol/l)
0	< 8	0	neg
1	8 - 11	1	≤50
2	11 - 16	2	51 - 100
3	16 - 21	3	101 - 150
4	21 - 25	4	151 - 200
5	≥25	5	201 - 250
	—	6	> 250

gekaracteriseerd door een 'bloedscore' en een 'urinescore', die kunnen variëren van 0 tot 5, respectievelijk tot 6. De sommatie van deze 2 scores geeft dan de voor dat polikliniekbezoek geldende 'totaalscore', welke dus maximaal 11 kan bedragen.

4.2 *Relatie van de 'klassieke' parameters en gsHb-spiegels.*

In de literatuur wordt inmiddels aangenomen, dat bepaling van een gsHb-spiegel een goede indruk geeft over de kwaliteit van de diabetes-regeling (cf. hoofdstuk 1). Teneinde dit voor de hier onderzochte groep patiënten na te gaan, werd voor alle patiënten uit groep A (behandeling met dieet alleen, of in combinatie met orale antidiabetica) en voor groep B (behandeling met dieet en insulinesubstitutie) per patiënt het gemiddelde berekend van respectievelijk alle verkregen bloedscores, urinescores en de daaruit afgeleide totaalscores. Bij

één patient uit groep B werd de urinescore en bijgevolg ook de totaalscore niet berekend, daar op basis van gestoorde nierfunctie (creatinine-klaring 30 ml./min.) kan worden aangenomen, dat voor deze patiënt de mate aan glucosurie geen parameter is voor diabetesregulatie.

4.2.1 *Relatie bij alle patiënten uit groep A en B tezamen, en bij alle patiënten uit groep A, resp. B afzonderlijk.*

Berekend voor alle patiënten uit groep A en B tezamen, blijken de drie gemiddelde scores goed te correleren aan de gemiddelde gsHb-waarden (figuur 4.1, 4.2 en 4.3; tabel 4.2). Indien deze bewerkingen echter worden uitgevoerd voor groep A en B afzonderlijk, wordt een ander beeld verkregen. Voor groep A blijft een goede relatie bestaan tussen de drie gemiddelde scores en de gemiddelde gsHb-spiegels; bij groep B correleren de genoemde parameters duidelijk minder goed (tabel 4.2).

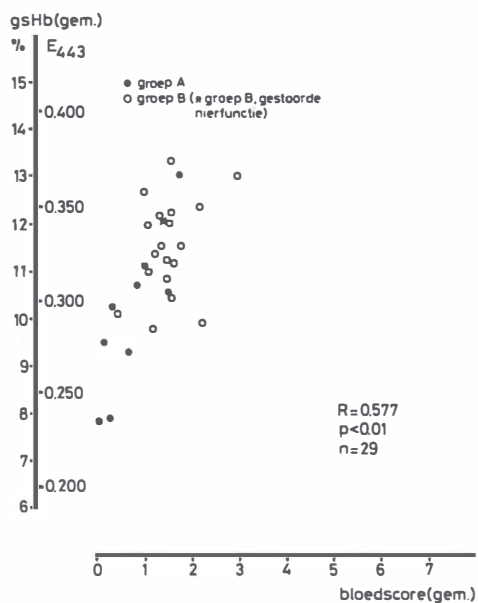
4.2.2 *Relatie bij individuele patiënten uit groep B.*

Bij zes patiënten uit groep B (met relatief frequente contrôles, zodat de navolgende berekeningen uitgevoerd konden worden) werd per persoon de correlatie-coëfficiënt uitgerekend van de actuele totaalscores en de actuele gsHb-waarden (parameters, verkregen bij éézelfde contrôle). De gevonden waarden zijn in tabel 4.3 vermeld. Er blijkt bij twee patiënten een goede correlatie te bestaan; bij vier niet.

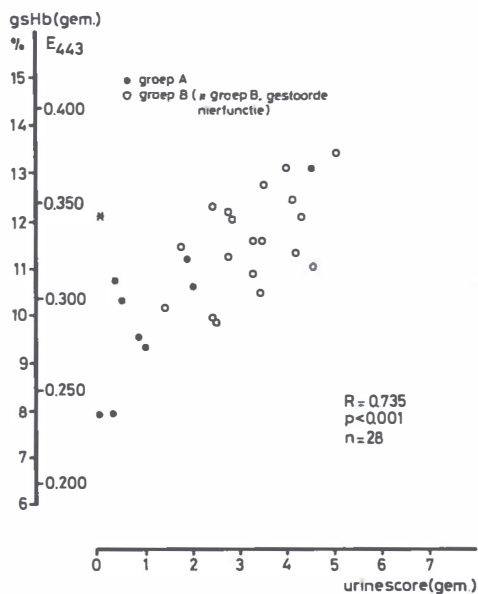
Tevens werd bij deze zes patiënten nagegaan of de gsHb-spiegels beter correleerden met het gemiddelde van de totaalscores, verkregen bij de polikliniek-bezoeken in de twee maanden, voorafgaande aan het betreffende polikliniek-

Tabel 4.2

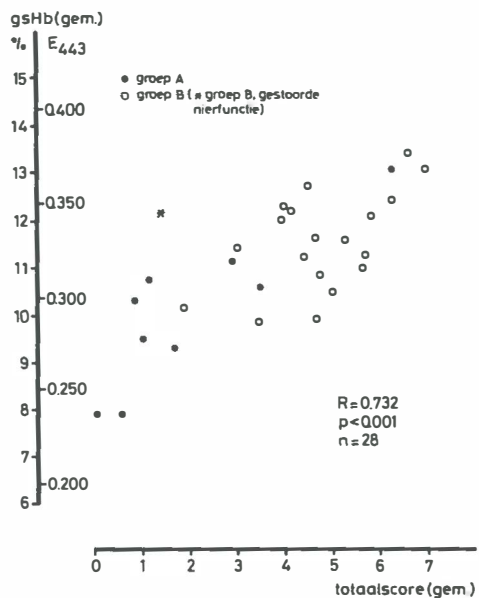
	groep		
	A + B	A	B
bloed score	R = 0,577 p < 0,01 (n = 29)	R = 0,867 p < 0,01 (n = 9)	R = 0,180 p > 0,10 (n = 20)
urine score	R = 0,735 p < 0,001 (n = 28)	R = 0,733 p < 0,05 (n = 9)	R = 0,449 p < 0,10 (n = 19)
totaal score	R = 0,732 p < 0,001 (n = 28)	R = 0,817 p < 0,02 (n = 9)	R = 0,414 p < 0,10 (n = 19)



Figuur 4.1
Relatie tussen gemiddelde gsHb-
spiegels en gemiddelde bloedsco-
res bij patiënten uit groep A en B
• groep A ○ groep B
(* groep B, gestoorde nierfunctie)



Figuur 4.2
Relatie tussen gemiddelde gsHb-
spiegels en gemiddelde urinesco-
res bij patiënten uit groep A en groep
B
• groep A ○ groep B
(* groep B, gestoorde nierfunctie)



Figuur 4.3

Relatie tussen gemiddelde gsHb-spiegels en gemiddelde totaalscores bij patiënten uit Groep A en groep B

• groep A ○ groep B
(* groep B, gestoorde nierfunctie)

Tabel 4.3

Patiënt	correlatie totaalscores en gsHb-waarden	correlatie gem. van totaalscores laatste 2 mnd. en gsHb-waarden
R.	R = 0,686, p < 0,001 n = 32	R = 0,609, p < 0,001 n = 31
V.	R = 0,059, p > 0,10 n = 27	R = -0,004, p > 0,10 n = 26
B.	R = -0,122, p > 0,10 n = 23	R = -0,258, p > 0,10 n = 22
v.M.	R = 0,116, p > 0,10 n = 18	R = 0,130, p > 0,10 n = 17
G.D.	R = -0,075, p > 0,10 n = 17	R = 0,092, p > 0,10 n = 16
F.	R = 0,641, p < 0,02 n = 17	R = 0,445, p < 0,05 n = 15

bezoek. De ratio hiervan is, dat op deze wijze een actuele gsHb-spiegel wordt vergeleken met een gemiddelde maat voor regeling van de diabetes gedurende ongeveer de periode, waarin de glucosylering van het haemoglobine, van invloed op die gsHb-spiegel, heeft plaatsgehad (zie ook onder 1.5.3). De gevonden waarden blijken echter niet duidelijk van de eerder berekende correlaties te verschillen (tabel 4.3).

Zoals hierboven vermeld, blijken de correlaties tussen de totaalscores en de gsHb-spiegels bij de patiënten uit groep B grote inter-individuele verschillen te tonen. Dit kan worden geïllustreerd aan twee patiënten, patiënt R. en patiënt V. Bij patiënt R. wordt een goede relatie aangetroffen; bij patiënt V. is (bij een vrijwel even groot aantal contrôles) geen relatie aantoonbaar (tabel 4.3). Ten behoeve van een visuele vergelijking van het verloop van de totaalscores en de gsHB-waarden werden deze twee parameters voor beiden grafisch op een tijd-as uitgezet (fig. 4.4, resp. fig. 4.5).

4.2.3 Relatie bij individuele patiënten uit groep A.

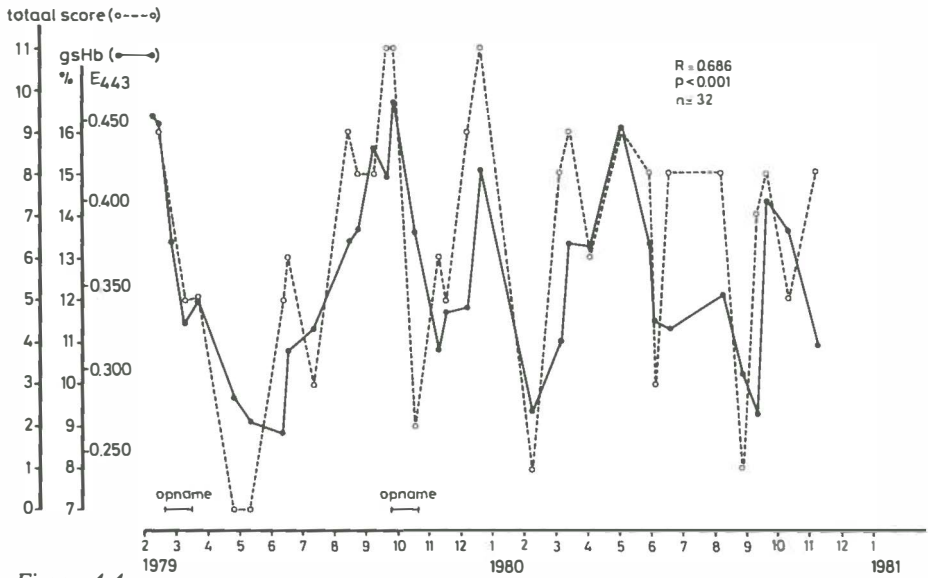
Zoals onder 4.2.1 werd aangegeven, is de correlatie van het gemiddelde van de totaalscores en het gemiddelde van de gsHb-waarden van alle patiënten uit groep A goed.

De berekende individuele correlaties tussen de totaalscores en de gsHb-waarden bij de patiënten uit deze groep zijn echter meestal niet significant. Oorzaak hiervan is, dat, zoals in hoofdstuk 3 reeds werd vermeld, de frequentie van de revisieafspraken afhankelijk was van de klinische situatie. Omdat de patiënten uit groep A relatief goed geregeld waren, zijn op grond hiervan per patiënt slechts een gering aantal contrôles verricht.

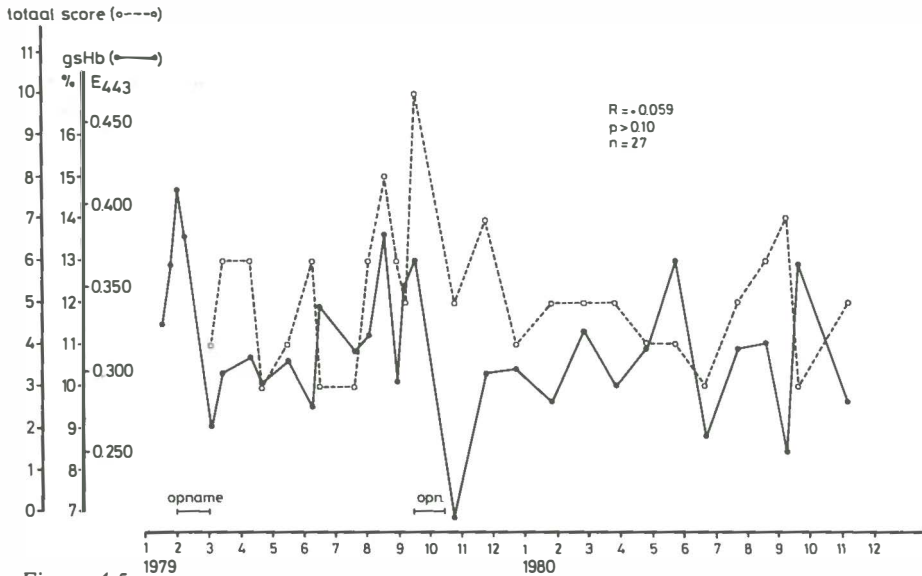
De meest veelvuldige contrôles bij de patiënten uit deze groep vinden we bij de patiënten G. en Sm. (met respectievelijk 10 en 20 contrôles – zie appendix A). Bij patiënte Sm. wordt tussen de totaalscores en de gsHb-waarden geen significant correlatie aangetroffen. Indien bij vergelijking van gsHb en totaalscore de gegevens, verzameld gedurende de eerste twee maanden na opneming in de studie, worden weggelaten, wordt wèl een significante correlatie gevonden ($R = 0,587$; $p < 0,05$). Het verloop van gsHb-waarden en totaalscores in de tijd wordt voor haar weergegeven in figuur 4.6. Voor de andere patiënt (G.) geschiedt dit in figuur 4.7. De correlatie tussen de gsHb-waarden en de totaalscores bedraagt bij deze patiënt 0,642; $p < 0,10$; de correlatie van actuele gsHb-spiegels en de gemiddelden van totaalscores gedurende twee maanden, voorafgaande aan afname van de gsHb-spiegels, bedraagt 0,713 ($p < 0,05$).

4.2.4 Bespreking van de resultaten.

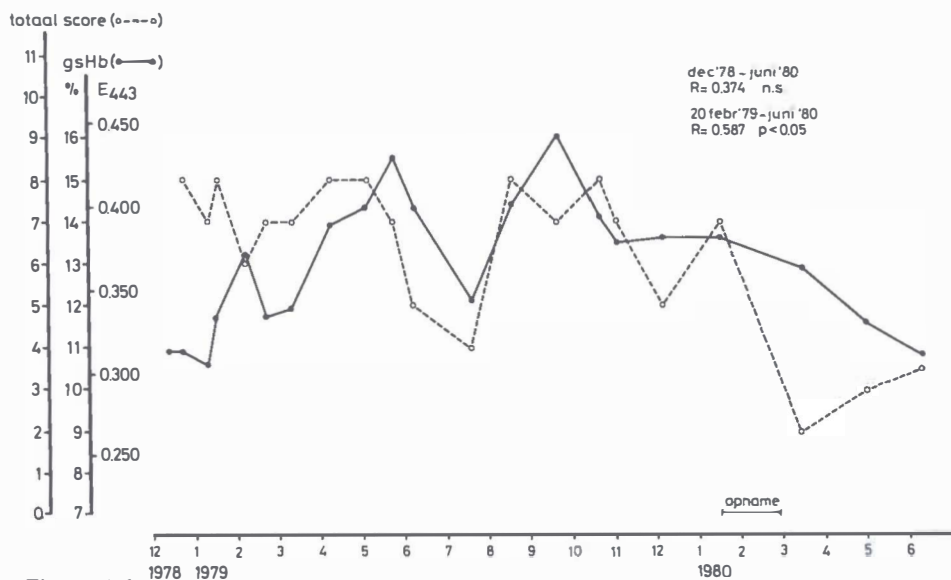
Bepaling van het gsHb bij een groep van diabeten, die geen insuline-substitutie gebruiken (groep A) geeft een goede indruk over de regeling van de diabetes; bij een groep van diabeten, die wèl insuline gesubstitueerd krijgen (groep B), blijkt dit niet het geval. Indien de correlaties tussen gsHb en de 'klassieke' pa-



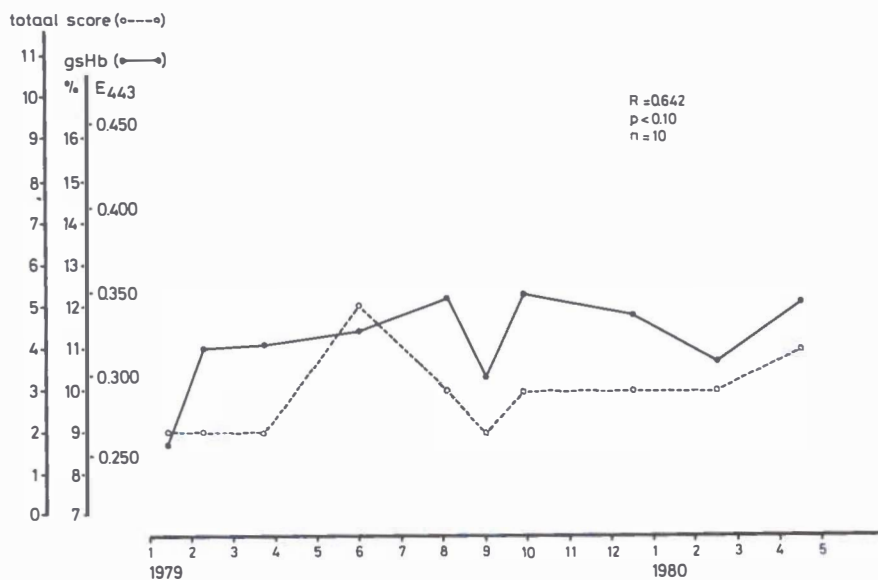
Figuur 4.4
 Patiënt R.; verloop van gsHb-waarden en totaalscores in tijd



Figuur 4.5
 Patiënt V.; verloop van gsHb-waarden en totaalscores in de tijd



Figuur 4.6
Patiënte Sm.; verloop van gsHb-waarden en totaalscores in de tijd



Figuur 4.7
Patiënt G.; verloop van gsHb-waarden en totaalscores in de tijd

rameters voor diabetesregulatie binnen groep B per patiënt berekend worden, blijken er zeer grote onderlinge verschillen te bestaan. Bij bijv. patiënt R. (tabel 4.3) wordt een goede relatie aangetroffen; bij patiënt V. wordt (bij een vrijwel even groot aantal contrôles) echter geen relatie gevonden. Ten behoeve van een visuele vergelijking van het verloop van de totaalscores en de gsHb-waarden werden deze twee parameters voor beide patiënten grafisch op een tijd-as uitgezet (fig. 4.4, resp. fig. 4.5). Beide patiënten blijken slecht geregeld; beiden werden tijdens de observatie-periode twee keer gehospitaliseerd wegens ontregeling van de diabetes mellitus. Bij patiënt R. (fig. 4.4) verlopen de fluctuaties in regeling echter meer geleidelijk dan bij patiënt B. – of anders gezegd, bij meerdere contrôles wordt een verdere verslechtering of een verdere verbetering van de bij het vorige polikliniekbezoek bestaande totaalscore aangetroffen. Bij patiënt V. (fig. 4.5) daarentegen worden veel polikliniekbezoeken, waarbij een betere totaalscore werd behaald, direct gevolgd door een polikliniekbezoek met een slechtere totaalscore (of vice versa); de fluctuaties in diabetesregulatie volgen elkaar bij deze patiënt sneller op dan bij patiënt R. Bij patiënt R. lijkt het verloop van de gsHb-waarden dat van de totaalscores redelijk te volgen; bij patiënt V. is hiervan geen sprake. Deze indruk wordt bevestigd door de voor beide patiënten gevonden correlatiecoëfficiënten van beide parameters.

De indruk, dat de gsHb-waarde slechts een redelijke maat voor de diabetesregeling is in geval van constante dan wel geleidelijk veranderende regeling, kan worden onderbouwd door theoretische beschouwingen aan de hand van een kinetisch model betreffende glucosylatie van haemoglobine (zie hoofdstuk 6). De gedemonstreerde patiënten R. en V. nemen hierbij ten aanzien van het patroon, waarin wisselingen in diabetesregulatie elkaar opvolgen, binnen groep B. elk een extreme positie in. Patiënt R. vertoont hierbij de meeste gelijkenis met het patroon, dat verwacht wordt bij de gemiddelde diabeet, die zonder insuline-substitutie wordt behandeld. Bij patiënten uit groep A. mag men immers een meer stabiele mate aan regeling veronderstellen, dan bij de gemiddelde patiënt uit groep B. Overeenkomstig de verwachtingen blijkt dan ook de correlatie tussen gsHb en totaalscore bij groep A. goed te zijn. Individuele correlaties, berekend voor de patiënten uit groep A., blijken echter veelal niet significant. Per persoon zijn voor de patiënten uit groep A. dan ook relatief weinig meetpunten aanwezig. Bij patiënt G., bij wie binnen de onderzoeksperiode tien contrôles plaatsvonden, wordt wel een correlatie aangetroffen tussen de totaalscores en de gsHb-waarden (fig. 4.7). Bij patiënte Sm., bij wie twintig contrôles geschieden, blijken de bovenstaande parameters echter niet te correleren. Indien de totaalscores en de gsHb-waarden voor deze patiënte op een tijd-as worden uitgezet (fig. 4.6) blijkt gedurende vrijwel de gehele observatie-periode het gsHb-verloop dat van de totaalscore fraai te volgen. Slechts gedurende de eerste twee maanden worden relatief lage gsHb-waarden aangetroffen in relatie tot de slechte regeling, die tijdens deze periode bestond. Deze situatie is verklaarbaar, indien direct voorafgaande aan het begin van de observatieperiode een snelle verstoring van de glucose-huishouding zou zijn opgetreden, bijvoorbeeld op basis van een intercurrente infectieziekte. Getalsmatige gegevens over deze periode ontbreken echter, daar patiënte voor opne-

ming in de studie niet bij ons bekend was. Anamnesticus wordt geen steun gevonden voor het bestaan van factoren, die direct voorafgaande aan verwijzing aanleiding geweest zouden kunnen zijn voor een dergelijke, acute ontregeling van de diabetes mellitus. Er kan echter gesteld worden, dat de gsHb-spiegels, gevonden in deze eerste twee maanden, gedeeltelijk zijn ontstaan onder invloed van de regeling van de diabetes tijdens een periode, die zich aan directe waarneming heeft onttrokken. Indien op basis hiervan de gegevens van de eerste twee maanden niet worden verdisconteerd bij de vergelijking van gsHb-waarden en totaalscores, wordt ook bij deze patiënte een correlatie tussen deze parameters gevonden. Hiermede zou ook zij beantwoorden aan de veronderstelling, dat gsHb-spiegels slechts dan een aanwijzing over de diabetes-regulatie geven, indien er sprake is van een min of meer constante, dan wel geleidelijk veranderende mate aan regeling.

Aan het begin van hoofdstuk 3 werden een viertal vragen gesteld ten aanzien van de klinische waarde van de bepaling van gsHb-spiegels. Deze vragen waren:

- a. Geeft deze parameter een indruk over het resultaat van de behandeling van de diabetes mellitus?
- b. Verschilt de eventuele relatie tussen deze en andere parameters voor diabetesregulatie, afhankelijk van de groep van diabeten, waarbij deze bepaling wordt verricht?
- c. Is bepaling van deze parameter van concreet belang voor de behandeling van de diabeet?
- d. Over bij benadering welke periode informeert deze parameter over de mate van regulering van de diabetes mellitus?

Vraag d, waarover op dit moment geen uitspraak kan worden gedaan, komt in hoofdstuk 6 hernieuwd aan de orde. De overige vragen kunnen inmiddels beantwoord worden.

Een gsHb-spiegel geeft in zoverre een indruk over de glucosehuishouding bij een patiënt met diabetes mellitus, dat hogere waarden worden aangetroffen bij patiënten, die gemiddeld hogere bloedsuikerspiegels hebben, en lagere waarden bij minder sterk verhoogde bloedsuikerspiegels. De nauwkeurigheid, waarmee een gsHb-spiegel de mate aan regeling weergeeft, blijkt echter sterk afhankelijk van de wijze, waarop de bloedsuikerspiegels fluctueren. Bij een min of meer constante of slechts geleidelijk veranderende regeling blijkt een goede correlatie aanwezig tussen regeling en gsHb-spiegels. Indien echter een sterk wisselende mate aan regeling aanwezig is, blijken de weliswaar verhoogde gsHb-spiegels geen indicator te zijn voor de mate aan regeling. Het eerste patroon treft men meestal aan bij patiënten, die slechts met dieet, of met dieet in combinatie met orale antidiabetica worden behandeld; bij deze patiënten geeft een gsHb-spiegel dus veelal een goede indruk over de regeling van de betreffende patiënt. Het tweede patroon is frequent aanwezig bij insulinesubstitutie-afhankelijke patiënten; indien bij deze patiënten een gsHb-spiegel wordt gemeten zal deze veelal geen goed verband houden met de mate aan regeling. Het concrete belang van bepaling van gsHb-spiegels bij de behandeling van patiënten met diabetes mellitus is uit het bovenstaande duidelijk. Een gsHb-

spiegel geeft grofweg een indruk over de ernst van de diabetes mellitus c.q. de mate van regeling van de diabetes. Bij patiënten, die met dieet, al of niet in combinatie met orale antidiabetica worden behandeld, geeft het meestal een goede indruk over de mate van regeling; bij deze categorie patiënten zal echter bepaling van een gsHb-spiegel geen wezenlijk voordeel hebben in vergelijking met het gebruik van de klassieke parameters. Bij de insulineafhankelijke diabetes is de relatie met de bloedsuikerspiegels tenminste onzeker te noemen. Een gsHb-spiegel is dientengevolge niet een parameter om bijvoorbeeld de insuline-substitutiedosis te wijzigen.

Daarnaast zal men zich bij de interpretatie van een gsHB-spiegel te allen tijde moeten realiseren dat, naast de bloedsuikerspiegels, de overlevingsduur van de erythrocyten van invloed is op de mate van glucosylering van het haemoglobine (cf. 1.2).

Hoofdstuk 5

ENDOGENE INSULINE-RESERVE, DIABETESREGULATIE EN gsHb-SPIEGELS

5.1 *Inleiding.*

De mate van behoud van de glucose-homöostase is bij patiënten met diabetes mellitus deels afhankelijk van de endogene insuline-reserve. Daarnaast speelt, met name bij patiënten met overgewicht, perifere insuline-resistentie een rol. Bij patiënten zonder aanwijzingen voor perifere insuline-resistentie kan echter worden verwacht dat, naarmate de endogene insuline-reserve groter is, een betere regeling kan worden bereikt (77, 85, 54), en lagere gsHb-spiegels gevonden kunnen worden. Gepoogd werd, een dergelijke relatie in ons patiëntenmateriaal te vinden. Om van de insuline-reserve een indruk te krijgen, werd bij alle patiënten voor opname in de studie een glucagon-test verricht, waarbij als parameters insuline- (groep A) en C-peptide-spiegels (groep A en B) werden afgenomen (cf. hoofdstuk 3).

5.2 *Resultaten.*

Bij groep A bleek geen significante correlatie aanwezig tussen maximale C-peptide-stijging of maximale insuline-stijging tijdens de glucagon-test enerzijds en gsHb-spiegels of totaalscores anderzijds; basale insuline- of C-peptide-spiegels bleken evenmin significant gecorreleerd aan de gsHb-spiegels of totaalscores. Om voor de (grotere) groep B aan te tonen, dat een grotere insulinereserve bij deze patiënten een betere regeling (en lagere gsHb-spiegels) inhoudt, zou men de groep kunnen opdelen in twee subpopulaties op geleide van de endogene insuline-reserve. Op deze wijze werden de patiënten uit groep B op twee manieren in groepen verdeeld: 1 op geleide van de maximale C-peptide-response tijdens de glucagon-test (groep 1_a: max. C-pept. response $\geq 0,05$ nmol/l, n = 8; groep 1_b: max. C-pept. response $< 0,05$ nmol/l, n = 12), en 2 op geleide van de insulinesubstitutiedosis (groep 2_a: ≤ 40 E d.d., n = 10; groep 2_b: substitutiedosis > 40 E d.d., n = 10).^{*} Voor beide situaties werd berekend of een verschil aanwezig is tussen de medianen van de gemiddelde gsHb-spiegels of van de gemiddelde totaalscores tussen de beide, aldus geformeerde groepen. In géén van de gevallen kon echter een significant verschil worden aangetoond.

^{*}Uit tabel 5.1 blijkt, hoe de patiënten uit groep B over deze subgroepen verdeeld zijn. Hieruit is duidelijk, dat de indeling op grond van maximale C-peptide response niet overeenkomt met de indeling op grond van insuline-dosis. In tabel 5.2 worden nadere gegevens van de patiënten binnen de verschillende subgroepen verstrekt.

Tabel 5.1

	<u>1_a</u>	<u>1_b</u>
<u>2_a</u>	4	6
<u>2_b</u>	4	6

Tabel 5.2

Mediaan (*m*) en spreidingsgebreedte (*s*) van de subgroepen 1_a, 1_b, 2_a en 2_b t.a.v. C-peptide-response, insuline substitutie-dosis en gemiddelde totaalscore.

	C-peptide-response		insuline substitutie-dosis		gemiddelde totaalscore	
	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
1 _a	0,23	0,37	41	44	5,21	4,92
1 _b	0	0,04	47	56	4,57	5,14
2 _a	0	0,43	30	16	4,27	5,60
2 _b	0,02	0,13	56	38	4,85	4,76

5.3 Bespreking van de resultaten.

De aanwezigheid van endogene insuline-reserve zal bij een patiënt met insuline-afhankelijke diabetes mellitus deels bijdragen tot de mogelijkheid deze patiënt meer adequaat te regelen. Bij patiënten, waar andere factoren dan endogene insuline-reserve (zoals perifere insuline-resistentie) een belangrijke rol gaan spelen ten aanzien van de koolhydraat-homöostase, is een duidelijke relatie tussen endogene insuline-reserve en de mate aan regeling niet te verwachten. Bij de patiënten uit groep A (waarbinnen de mate aan storing van de koolhydraatstofwisseling niet bepaald wordt door een absoluut tekort aan endogeen insuline) kon dan ook geen relatie worden aangetoond tussen parameters

voor endogene insulinereserve en gsHb-spiegels. Binnen groep B, waar het bestaan van een dergelijke relatie wel aannemelijk is, werden de patiënten op twee verschillende wijzen verdeeld, zodanig dat telkenmale een groep werd geformeerd waarbinnen geen, of relatief geringe insulinereserve werd vermoed, en een groep waarbij meer insulinereserve werd vermoed. Eén keer werden de groepen geformeerd aan de hand van de grootte van de maximale C-peptide-response tijdens een glucagon-test; een tweede keer aan de hand van de benodigde insulinesubstitutiedosis. In geen van beide situaties bleek een significant verschil tussen de respectieve groepen te bestaan ten aanzien van de medianen van de totaalscores of die van de gsHb-spiegels.

Gonen et al. (51) hanteerden een soortgelijke proefopzet, waarbij bij een groep insuline-afhankelijke, niet-adipeuze diabeten wel een significante, inverse correlatie tussen basale C-peptide-spiegels en HbA_{1c}-spiegels of insuline-substitutiedosis werd gevonden. Tevens bestond een negatieve correlatie tussen de maximale C-peptide-response of de maximale C-peptide-spiegels bij een glucagon-test enerzijds en HbA_{1c}-spiegels anderzijds. De groep diabeten, waarbij deze waarnemingen werden gedaan, had echter een duidelijk grotere insulinereserve dan onze subgroep 1_a. Op grond van hun bevindingen concludeerden Gonen et al., dat nuchtere C-peptide-concentraties van meer dan 0,1 nmol/l endogene insuline-spiegels weergeven, die wezenlijk tot het behoud van de glucose-homöostase kunnen bijdragen. In de subgroep 1_a van ons patiënten-materiaal werd een basale C-peptide-spiegel van meer dan 0,1 nmol/l slechts bij 4 van de 8 patiënten, die van deze groep deel uitmaakten, gevonden. Geconcludeerd moet worden, dat een relatie tussen endogene insulinereserve en parameters voor diabetesregulatie bij niet-adipeuze, insuline-afhankelijke diabeten wel bestaat, doch slechts aantoonbaar is wanneer de reserve een bepaald minimum overschrijdt. Bij de hier beschreven patiënten bleek dit bij slechts een gering aantal het geval, waardoor verschillen niet aantoonbaar waren. De verschillen in insuline-dosis bij deze patiënten worden blijkbaar meer door andere factoren, dan door de resterende, endogene insulinereserve bepaald.

Hoofdstuk 6

EEN MATHEMATISCH MODEL BETREFFENDE DE KINETIEK VAN DE GLYCOSYLERING VAN HET HAEMOGLOBINE

6.1 *Inleiding.*

In de voorgaande hoofdstukken zijn een aantal eigenschappen van de geglycosyleerde fractie van het haemoglobine naar voren gekomen.

Uit de literatuur is gebleken, dat deze fractie verhoogd aanwezig is na een periode met hyperglycaemie. Bij sommige diabeten bestaat een fraaie correlatie tussen actuele gsHb-spiegels en de diabetesregulatie tijdens de periode, voorafgaande aan afname van deze spiegels; bij anderen is deze relatie matig; bij weer andere patiënten met diabetes mellitus is zij in het geheel niet aanwezig (cf. hoofdstuk 1.5). Uit eigen waarnemingen leek het waarschijnlijk, dat gsHb-spiegels met name dan een goede maat voor diabetesregulatie inhouden, als de glucosespiegels in het recente verleden niet, of slechts in geringe mate varieerden. Bij sterk wisselende glucosespiegels bleek geen correlatie aanwezig tussen klassieke parameters voor diabetesregulatie en gsHb-spiegels (cf. hoofdstuk 4).

Ten aanzien van de periode, over de diabetesregeling waarvan een gsHb-spiegel een indruk geeft, wordt in de literatuur meest ongeveer zes weken aangehouden. gsHb-spiegels bleken bij diabeten na snelle correctie van de hyperglycaemie na ongeveer één tot twee maanden op een lagere waarde te stabiliseren (48).

Tenslotte is gebleken, dat de hoogte van een gsHb-spiegel, behalve van de hoogte van de glucosespiegels en de duur, gedurende welke deze spiegels hebben bestaan, ook afhankelijk is van de overlevingsduur van de erythrocyten. Bij overigens gezonden met een haemolytische anaemie worden verlaagde gsHb-spiegels aangetroffen; bij diabeten met een haemolytische anaemie kunnen normale gsHb-spiegels bestaan (cf. hoofdstuk 1.2).

Teneinde dit op empirische wijze verkregen inzicht in de kinetiek van de glycosylering van haemoglobine te verklaren, ontwierp Dr. W.J. Sluiter een model, dat de vorming van geglycosyleerd haemoglobine beschrijft.

In dit hoofdstuk zal nader op dit model worden ingegaan, en zal het door het model voorspelde gedrag van de geglycosyleerde fractie van het haemoglobine worden vergeleken met uit eigen onderzoek verkregen resultaten en gegevens uit de literatuur.

6.2 *Beschrijving van het model.*

6.2.1 *HbA₁-concentratie in één erythrocyt.*

HbA₁ ontstaat door glycosylering aan de β -ketens van het haemoglobine. Om-

dat haemoglobine twee β -ketens heeft, kan men stellen, dat de concentratie aan β -ketens in de erythrocyt 2 MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) bedraagt. Indien glycosylatie aan deze β -ketens op niet-enzymatische wijze verloopt, kan de vormingssnelheid van HbA₁ worden beschreven als

$$k_x \cdot X \cdot (2 \text{ MCHC} - A).$$

In deze vergelijking staat k_x voor de reactieconstante, X voor de concentratie van glucose of een bepaalde glucose-metaboliët en A voor de concentratie aan reeds gemodificeerde β -ketens.

De verhouding van glucose en glucose-metaboliëten binnen de erythrocyt zal waarschijnlijk vrij constant zijn, gezien het feit dat bij hoge bloedsuikerspiegels de waarden van HbA_{1c}, HbA_{1a} en HbA_{1b} in gelijke mate verhoogd zijn. Op grond hiervan kan bovenstaande vergelijking vereenvoudigd worden door de metaboliëtconcentratie X te vervangen door de glucoseconcentratie G . De vormingssnelheid van geglycosyleerde β -ketens bedraagt dus

$$k'_x \cdot G \cdot (2 \text{ MCHC} - A).$$

De totale vormingssnelheid van alle gemodificeerde β -ketens kan worden gevonden door additie van de reactieconstanten van glucose en de diverse glucosemetaboliëten, die reageren met de β -ketens van haemoglobine:

$$(\Sigma k'_i) \cdot G \cdot (2 \text{ MCHC} - A) = k_1 \cdot G \cdot (2 \text{ MCHC} - A).$$

Indien glycosylering van haemoglobine een enigszins reversibel proces is, kan de wijziging van de concentratie aan geglycosyleerde β -ketens in een erythrocyt worden beschreven als

$$dA/dt = k_1 G (2 \text{ MCHC} - A) - k_2 A.$$

Waarbij k_2 staat voor de reactieconstante van de ontleding.

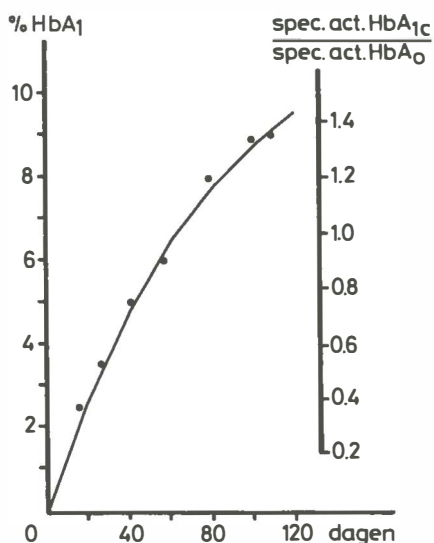
De concentratie A in een erythrocyt van een willekeurige leeftijd van t dagen wordt verkregen door integratie:

$$A = \frac{k_1 G}{k_1 G + k_2} 2 \text{ MCHC} (1 - e^{-(k_1 G + k_2)t}).$$

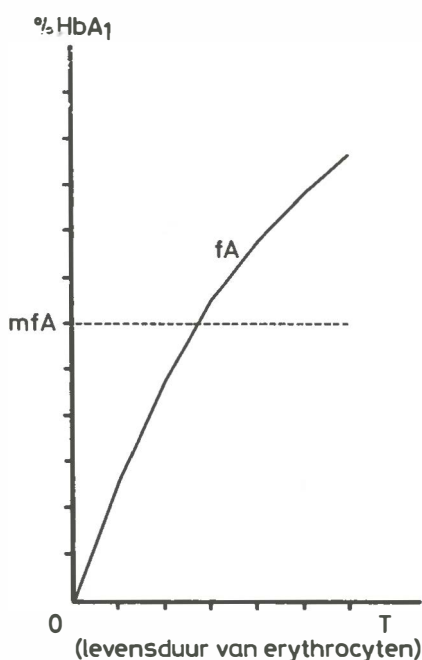
Na deling door 2 MCHC wordt de fractie fA van het totaal aan β -ketens verkregen, dat is geglycosyleerd:

$$fA = \frac{k_1 G}{k_1 G + k_2} (1 - e^{-(k_1 G + k_2)t}).$$

Aannemende dat $k_1 = 3 \cdot 10^{-4}$ L/mmol, 24 uur, en $k_2 = 10^{-2}/24$ uur, kan de verandering van fA in een enkele erythrocyt gedurende zijn gehele levensduur van 120 dagen bij een constante glucosespiegel van 5 mmol/l worden berekend (fig. 6.1). Deze curve komt overeen met de experimentele gegevens van Bunn et al. (13) (cf. hoofdstuk 1.4). Zoals door deze auteurs is beschreven, wijzen



Figuur 6.1
De berekende verandering van de fractie HbA_{1c} bij een glucosespiegel van 5 mmol/l in één erythrocyt, gedurende de 120 dagen van haar leven (getrokken lijn). De ratio van de actuele specifieke activiteit van HbA_{1c} en HbA_0 na cohortlabeling (naar Bunn et al) wordt weergegeven door gesloten cirkels



Figuur 6.2
De relatie tussen de fractie fA aan HbA_{1c} in één erythrocyt als functie van haar overlevingsduur T , en de gemiddelde fractie mfA aan HbA_{1c} , in alle circulerende erythrocyten

deze gegevens erop dat de vorming van HbA_{1c} een enigszins reversibel proces is (of dat er een langzame afbraak van HbA_{1c} bestaat), waardoor een niet-lineair verband bestaat tussen de HbA_{1c} -fractie en de leeftijd van erythrocyten. De vorming van HbA_{1a} en HbA_{1b} blijkt eveneens een reversibel proces (13).

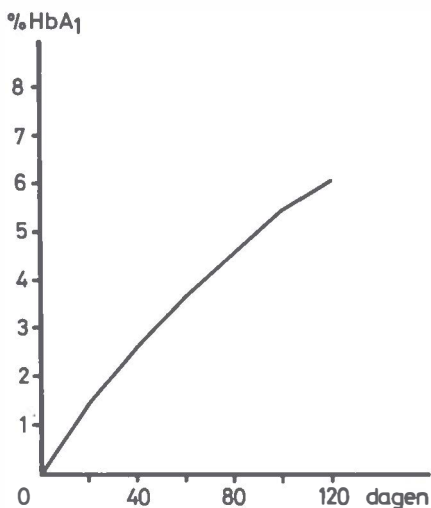
6.2.2 De gemiddelde HbA_{1c} -concentratie.

Uitgaande van een constante dagelijkse productiesnelheid van erythrocyten en een constante glucosespiegel gedurende de totale levensduur van de erythrocyten, T , kan de gemiddelde HbA_{1c} -fractie (mfA) van het haemoglobine in de circulerende erythrocyten berekend worden. Zoals uit figuur 6.2 blijkt, is het oppervlak van de rechthoek $mfA \times T$ gelijk aan het oppervlak $fA \cdot dt$ onder de curve van fA . Daarom is

$$mfA = (1/T) \int_0^T fA \cdot dt = \frac{k_1 G}{k_1 G + k_2} \left(1 - \frac{1}{(k_1 G + k_2)T} + \frac{e^{-(k_1 G + k_2)T}}{(k_1 G + k_2)T} \right)$$

Hieruit blijkt dat het percentage HbA₁ in een haemolysaat, behalve van de waarden van k_1 en k_2 , afhankelijk is van de constante glucosespiegel G en van de overlevingstijd T van de erythrocyten. In figuur 6.3 wordt de relatie tussen de HbA₁-spiegel en de overlevingstijd van de erythrocyten bij een constante glucosespiegel van 5 mmol/l weergegeven.

De door dit model voorspelde afneming van het percentage aan geglycosyleerd haemoglobine bij een verkorting van de overlevingsduur van de erythrocyten wordt aangetroffen bij bijvoorbeeld patiënten met een haemolytische anaemie (cf. hoofdstuk 1.2; ref. 57, 13, 64, 24).



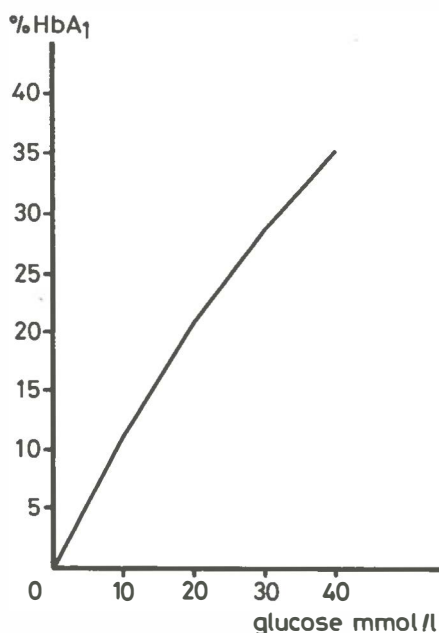
Figuur 6.3

De gemiddelde fractie aan HbA₁ in erythrocyten als functie van hun overlevingsduur T bij een constante glucosespiegel van 5 mmol/l (K_1 en K_2 als in figuur 6.1)

Bij een normale overlevingsduur van de erythrocyten van 120 dagen wordt meer geglycosyleerd haemoglobine gevormd, naarmate de gemiddelde glucosespiegel hoger ligt (fig. 6.4). Bij de berekeningen werd uitgegaan van een constante glucosespiegel; deze samenhang zal echter ook opgaan voor gemiddelde dagelijkse glucosespiegels, onder voorwaarde dat deze gemiddelde glucosespiegels gedurende de overlevingsduur van de erythrocyten van dag tot dag constant zijn.

6.2.3 Wijzigingen van de HbA₁-fractie in relatie tot wijzigingen in de glucosespiegel.

Tot zover is slechts gesproken over situaties, waarbij een constante gemiddelde glucosespiegel van dag tot dag aanwezig is. Veranderingen in de HbA₁-con-

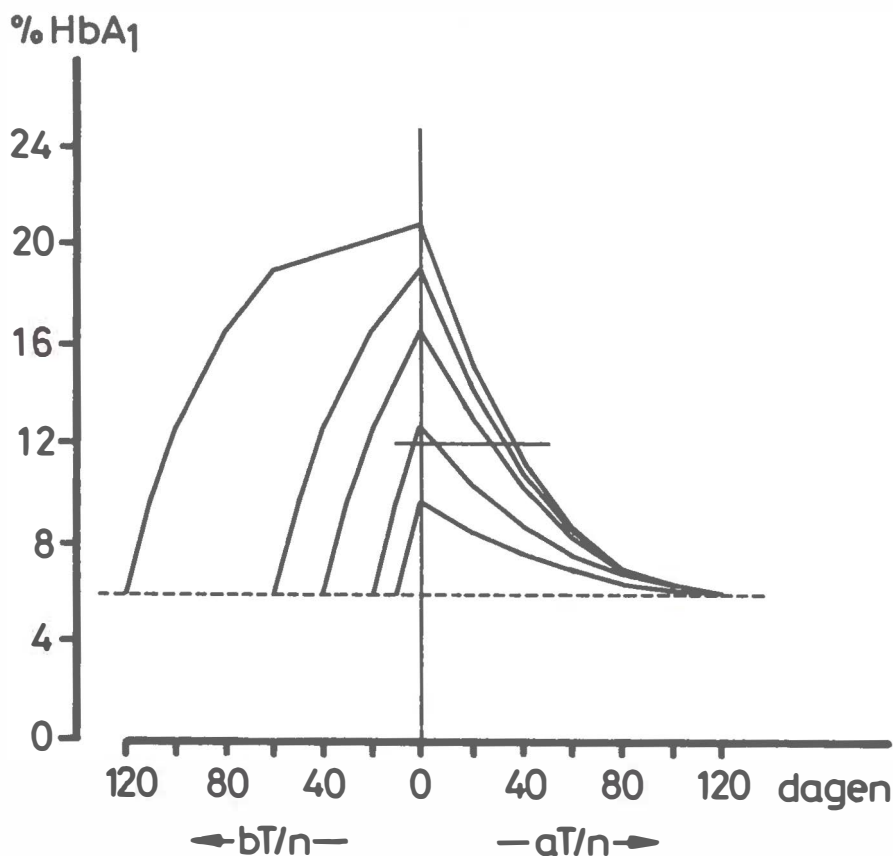


Figuur 6.4

De gemiddelde fractie aan HbA₁ als functie van constante glucosespiegels, bij een normale overlevingsduur van 120 dagen (K_1 en K_2 als in figuur 6.1)

centratie, teweeggebracht door een wijziging in de gemiddelde dagelijkse glucosespiegel, kunnen eveneens berekend worden. Voor de formule, die hiertoe werd afgeleid, wordt verwezen naar Appendix B. Op deze wijze kunnen veranderingen van de HbA₁-fractie berekend worden, bijvoorbeeld uitgaande van een constante gemiddelde glucosespiegel $G_3 = 5$ mmol/l, gevolgd door een te variëren periode van bT/n dagen met een constante gemiddelde glucosespiegel van $G_2 = 20$ mmol/l, waarna een herstel van de glucosespiegel tot een waarde van $G_1 = 5$ mmol/l gedurende een te variëren periode van aT/n dagen. De wijzigingen van de grootte van de HbA₁-fractie hierbij bij elke gekozen waarde voor de duur van de perioden bT/n en aT/n vallen af te lezen uit figuur 6.5. Zoals uit deze figuur blijkt, voorspelt het model enigszins andere halfwaardetijden voor een toeneming van de HbA₁-fractie dan voor een afneming ervan. Bij de weergegeven combinatie ($G_2 = 20$ mmol/l; $G_3 = G_1 = 5$ mmol/l) vinden we een halfwaardetijd van 24 dagen bij de toeneming van de HbA₁-fractie. De halfwaardetijd bij de afneming is afhankelijk van de duur, gedurende welke hoge bloedsuikerspiegels hebben bestaan; deze varieert van 25 dagen voor $bT/n = 120$ dagen tot 33 dagen voor $bT/n = 5$ dagen. Deze voorspelde halfwaardetijd van ongeveer vier weken komt overeen met de gegevens over het verloop van de HbA₁-fractie, verkregen na snelle normalisering van de glucosespiegel bij diabetes (48).

In het bovenstaande werd besproken op welke wijze de grootte van de $\text{HbA}_{1\text{-}}$ fractie zal veranderen door wijzigingen in de glucosespiegel. Hieruit valt direct op, dat door het bepalen van een enkele $\text{HbA}_{1\text{-}}$ spiegel geen enkel inzicht verkregen kan worden over glucosespiegels uit de periode, voorafgaande aan afneming van deze spiegel. Het $\text{HbA}_{1\text{-}}$ spiegel van 12% kan immers inhouden, dat de gemiddelde glucosespiegel constant 10,7 mmol/l heeft bedragen (fig. 6.4), of dat deze spiegel 5 mmol/l is geweest tot 19 dagen geleden, toen de spiegel opliep tot 20 mmol/l. Verder zou de glucosespiegel constant 5 mmol/l hebben kunnen bedragen, onderbroken door een periode met een gemiddelde



Figuur 6.5

De grootteveranderingen van de $\text{HbA}_{1\text{-}}$ fractie tengevolge van een stijging van de bloedglucosespiegel uitgaande van een normale waarde van 5 mmol/l naar 20 mmol/l, gedurende variabele perioden van bT/n dagen, gevolgd door normalisatie van bloedglucosespiegels gedurende aT/n dagen, in erythrocyten met een normale levensduur
Voor verklaring van de horizontale lijn zie tekst

spiegel van 20 mmol/l met een duur van 20 dagen, die 5 dagen geleden eindigde, of onderbroken door een periode van 40 dagen, die 26 dagen geleden eindigde, of onderbroken door een periode van 60 dagen, die 32 dagen geleden eindigde, enzovoort (fig. 6.5; langs de horizontale lijn van links naar rechts). Uiteraard kunnen andere tijdsrelaties verwacht worden bij veranderingen in de glucosespiegel van een andere grootte – de conclusie luidt echter hetzelfde: een verhoogde HbA₁-spiegel informeert slechts over het feit, dat in het recente verleden een periode met hyperglycaemie heeft bestaan, doch geeft geen inzicht over de ernst van de ontregeling, de duur of het moment ervan.

In figuur 6.5 werd de grootte-verandering van de HbA₁-fractie door een enkele ontregeling van een variabele duur weergegeven. In het geval van meerdere ontregelingen van kortere duur, waarbij de grootte van deze ontregelingen gelijk is als in de situatie van fig. 6.5, zullen de veranderingen van de HbA₁-fractie kleiner zijn. In figuur 6.6 zijn, berekend met de formule uit Appendix B, de wijzigingen van de HbA₁-fractie weergegeven in een situatie, waarbij de glucosespiegel om de 20 dagen van 5 naar 20 mmol/l oploopt en vice versa, en dan gedurende 20 dagen van een constante grootte blijft.

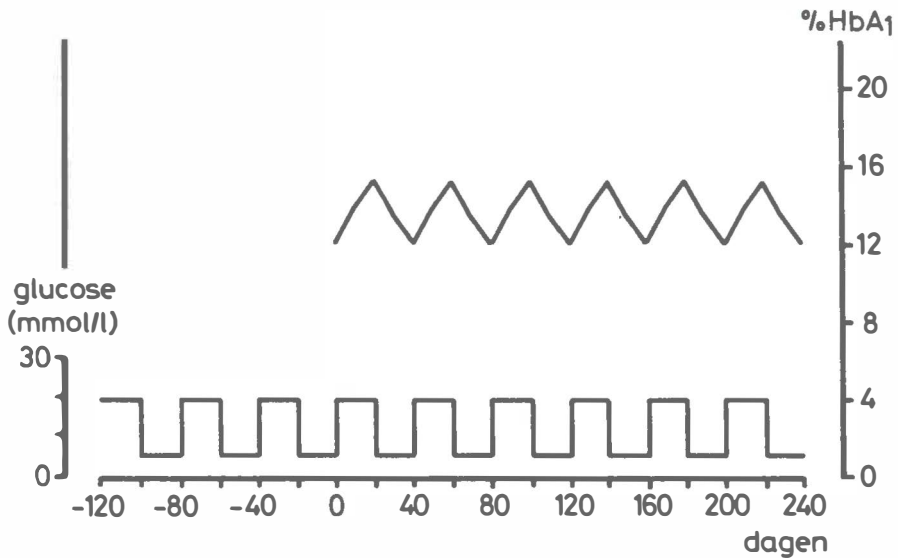
Als een patiënt met een dergelijk verloop van de glucosespiegel gedurende 240 dagen elke 2 weken zou zijn gecontroleerd, zou geen correlatie gevonden kunnen worden tussen de actuele HbA₁-spiegels en de actuele glucosespiegels (fig. 6.7a) of tussen de actuele HbA₁-spiegels en het gemiddelde van de glucosespiegels, die werden gevonden tijdens de vier controles gedurende de voorafgaande zes weken (fig. 6.7b). In de figuren 6.7a en 6.7b is de getrokken lijn de relatie, die te verwachten zou zijn bij constante glucosespiegels (zie fig. 6.4). Wel wordt bij elke controle, ook na drie weken met normoglycaemie, een verhoogde HbA₁-spiegel aangetroffen.

6.3 Conclusies.

Met behulp van het opgestelde model betreffende de kinetiek van de glycosylering van haemoglobine zijn een aantal uit patiënten-onderzoek verkregen gegevens ten aanzien van het gedrag van het gsHb goed te verklaren.

Hoewel deze vergelijkingen in de bovenstaande tekst reeds her en der ter sprake kwamen, zullen ze hieronder nogmaals systematisch worden vermeld.

a. Bij overigens gezonden met een haemolytische anaemie worden verlaagde gsHb-spiegels aangetroffen (57, 13); de gsHb-spiegel is bij niet-diabeten te gebruiken als parameter voor haemolyse (24); bij diabeten, lijdende aan een haemolytische anaemie kunnen normaal uitvallende gsHb-spiegels gevonden worden (64). Uit het model blijkt, dat de gsHb-spiegel afhankelijk is van reactie-constanten, van de glucosespiegel en van de overlevingstijd van de erythrocyten. Bij een gelijkblijvende glucosespiegel neemt bij verkorting van de overlevingstijd de gemiddelde gsHb-spiegel per erythrocyt af (cf. fig. 6.3). In een situatie, waarbij zowel een verhoogde glucosespiegel als een verkorte overlevingsduur van de erythrocyten aanwezig is, kunnen, afhankelijk van de ernst van respectievelijk de hyperglycaemie en de haemolyse, gsHb-spiegels lager, gelijk aan of hoger dan normaal zijn.



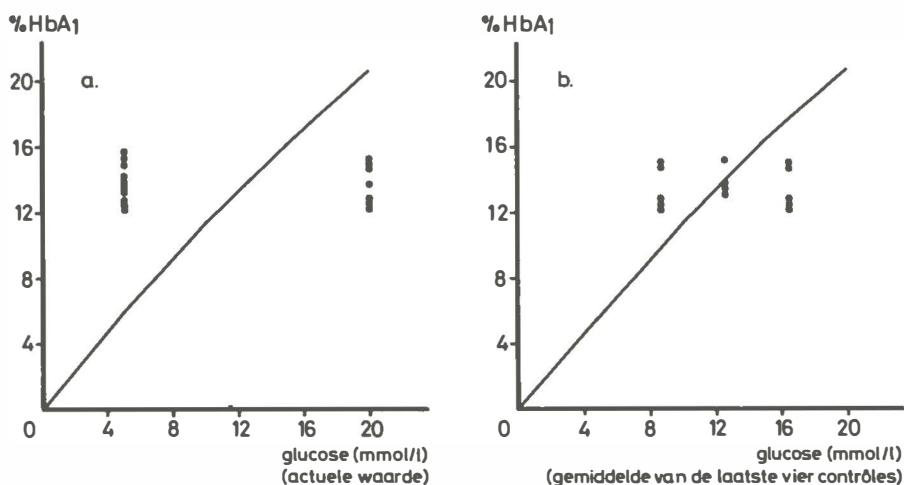
Figuur 6.6

Grootteveranderingen van de HbA_{1c}-fractie als gevolg van alternerende perioden van 20 dagen met respectievelijk bloedglucosespiegels van 5 en 20 mmol/l (K_1 en K_2 als in figuur 6.1)

b. In de literatuur wordt meestal aangenomen, dat een gsHb-spiegel een indruk geeft over de hoogte van de glucosespiegels gedurende de vier tot acht weken, die verlopen voorafgaande aan afname van die spiegel. Dit blijkt een controversieel gegeven. Na een enkele periode met toegenomen glycosylatie van haemoglobine door ernstige hyperglycaemie zal de daardoor verhoogde gsHb-spiegel slechts afnemen door 1. het afsterven van de erythrocyten met hoge intracellulaire gsHb-spiegels, 2. door de aanmaak van jonge erythrocyten, waarbij de intracellulaire gsHb-spiegel niet abnormaal sterk oploopt door het ontbreken van hoge glucosespiegels na de fase met hyperglycaemie, waarvan werd uitgegaan (cf. fig. 6.5) en 3. het geringe, reversibele karakter van dit product. In principe is de herinnering aan deze periode in de vorm van een verhoging van de gsHb-spiegel, eerst na afsterven van de langstlevende erythrocyt, die ten tijde van deze periode met hyperglycaemie circuleerde, uitgewist. Bij recidiverende perioden met hyperglycaemie worden de effecten van enerzijds toenemende glycosylatie en anderzijds afnemende gsHb-spiegels door bovengenoemde drie oorzaken gesuperponeerd (cf. fig. 6.6). Het zal duidelijk zijn, dat over de periode, over welke een gsHb-spiegel informeert met betrekking tot de diabetesregeling, geen uitspraak mogelijk is.

Wel valt uit het model de halfwaardetijd van een geglycosyleerd haemoglobine-product af te leiden; deze bedraagt ongeveer vier weken. Deze halfwaardetijd is compatibel met de gegevens over de daling van de gsHb-spiegel na snelle correctie van de hyperglycaemie bij diabetespatiënten.

c. Uit de literatuur zijn de gegevens over de correlatie van gsHb-spiegels met andere parameters betreffende diabetesregulatie wisselend. Bij diabetes, die behandeld worden met een dieet, of een dieet in combinatie met orale antidiabetica, wordt gewoonlijk een goede correlatie gevonden (cf. hoofdst. 1.5.2). Bij insuline-afhankelijke diabetes is deze correlatie vrijwel altijd slechter dan bij de eerder genoemde groep diabetes. Er zijn auteurs, die bij insuline-afhankelijke diabetes geen correlatie vinden tussen gsHb-spiegels en de gebruikelijke parameters voor diabetesregulatie (cf. hoofdst. 1.5.3).



Figuur 6.7
Voor verklaring zie tekst

In eigen patiëntenmateriaal werd een overeenkomstig patroon aangetroffen (hoofdst. 4). Bij de patiënten, die geen insuline gebruiken, blijken gsHb-spiegels goed te correleren met de klassieke parameters voor diabetesregulatie. Bij patiënten, die wel insuline gebruiken, bestaat als groep een veel slechtere correlatie, waarbij echter grote, inter-individuele verschillen blijken te bestaan. De indruk werd gewekt, dat gsHb-spiegels beter met de klassieke parameters correleren naarmate de regeling van de diabetes constant is, dan wel geleidelijk verandert (cf. hoofdst. 4.2.4). Het model voorspelt dat een gsHb-spiegel de gemiddelde glucosespiegel zal weergeven – en derhalve een indruk zal geven over de diabetesregeling, gedurende de periode, voorafgaande aan afname van deze spiegel – mits een constante, of een langzaam oplopende of afnemende dagelijks gemiddelde glucosespiegel aanwezig is. In dit geval zal de gsHb-spiegel met een kort interval de glucosespiegels volgen, zelfs als de klinische toestand uitmondt in een uitgesproken ontregeling. Een voorbeeld van een dergelijke patiënt wordt gegeven in hoofdstuk 4 (pat. R., fig. 4.4). Bij deze patiënt werd een goede correlatie gevonden tussen het gemiddelde van de gsHb-spiegels en het gemiddelde van de totaal-scores gedurende de laatste zes weken. Indien echter duidelijke fluctuaties in regulering bestaan binnen relatief

korte perioden, zullen veranderingen van de gsHb-spiegel gevonden worden, die volledig uit fase zijn met de veranderingen van de gemiddelden van de glucosespiegels gedurende de laatste zes weken. Een voorbeeld van een dergelijke situatie bestaat bij patiënt V. (fig. 4.5). Door de sterke fluctuaties van de diabetesregeling bestaat geen correlatie tussen de actuele gsHb-waarden en de gemiddelden van de glucosespiegels gedurende de laatste zes weken.

Op basis van de hierboven beschreven kinetische aspecten van het gsHb kunnen inmiddels twee situaties genoemd worden, waarbij gsHb-spiegels géén goede indruk zullen geven over de diabetesregulatie gedurende de afgelopen periode:

- a. indien bij de betreffende patiënt sprake is van sterk fluctuerende bloedsuikerspiegels,
- b. tijdens of relatief kort na een reticulocyten-crise, of indien een gestoorde overlevingsduur van de erythrocyten bestaat door bijvoorbeeld haemolyse.

Hoofdstuk 7

VERLOOP VAN gsHb-SPIEGELS BIJ SNELLE CORRECTIE VAN HYPERGLYCAEMIE DOOR MIDDEL VAN CONTINUE SUBCUTANE INSULINE INFUSIE (C.S.I.I.)

7.1 *Inleiding.*

De snelheid, waarmee gsHb-spiegels kunnen afnemen na correctie van een periode met hyperglycaemie, is in de recente literatuur uitgebreid aan de orde gesteld (93, 67, 83). De in eerste instantie gerapporteerde zeer snelle daling blijkt veroorzaakt te worden doordat HbA_{1c} -spiegels werden gemeten met behulp van een kolommethode. Hierbij wordt de niet-stabiele Schiff-base van HbA_{1c} meegemeten (98, 100, 95, 83). Bij lagere bloedglucosewaarden disassocieert deze verbinding snel in glucose en HbA_0 (74, 94, 99). Indien een bloedmonster wordt geëquilibreerd aan een glucose-vrije oplossing, voordat met behulp van een kolommethode de HbA_1 (of HbA_{1c})-fractie wordt bepaald, wordt dit instabiele voorstadium niet meegemeten. Bij colorimetrische methoden wordt, ook bij aanwezigheid van een instabiel voorstadium, slechts het stabiele eindproduct, de keto-amine, gemeten.

Over de snelheid van daling van deze stabiele fractie zijn weinig gegevens bekend. De snelste daling zal verkregen worden indien men bij een patiënt met een chronische hyperglycaemie abrupt een duurzame euglycaemie bewerkstelligt. Een dergelijke manoeuvre is bij uitstek realiseerbaar met behulp van de Biostator®. Hierbij wordt op geleide van continue bloedsuikermetingen intraveneus insuline (en eventueel glucose) afgegeven (75). In een opstelling, waarbij snelheid van daling van gsHb-spiegels het oogmerk is, is de Biostator® echter niet bruikbaar. De Biostator® is op technische gronden maximaal slechts ongeveer drie etmalen in een continue opstelling te gebruiken, terwijl voor de beoordeling van de daling van gsHb-spiegels een langere periode van euglycaemie noodzakelijk is.

Een tweede mogelijkheid tot het snel bereiken van euglycaemie wordt gevonden in de continue subcutane insuline-infusie (C.S.I.I.). Hierbij wordt door middel van een draagbaar pompje continu subcutaan insuline toegediend. De hoeveelheid insuline wordt vastgesteld op geleide van bloedsuikerbepalingen in bloed, dat op gebruikelijke wijze wordt afgenomen. Voorafgaande aan gebruik van maaltijden wordt manueel of automatisch (afhankelijk van het type pomp, dat gebruikt wordt) een extra hoeveelheid insuline als 'boost' aan de basale insuline-afgifte toegevoegd (6). Op deze wijze is bij veel diabeten binnen korte tijd een adequate regulering van de diabetes mellitus realiseerbaar. De hoeveelheid insuline, die basaal continu toegediend moet worden, dient echter, evenals de grootte van de 'boosts' voorafgaande aan de maaltijden, per patiënt individueel en empirisch te worden vastgesteld. Op grond hiervan duurt het meestal meerdere dagen totdat een optimale instelling is bereikt. gsHb-spiegels Bij diabeten, die middels C.S.I.I. in een euglycaemische situatie worden gebracht, zullen derhalve veelal niet maximaal snel dalen. Dit gegeven

dient echter als compromis te worden aanvaard, indien ten behoeve van het registreren van het verdere verloop van de daling van de gsHb-spiegels, een langer durende periode van normoglycaemie gehandhaafd dient te worden.

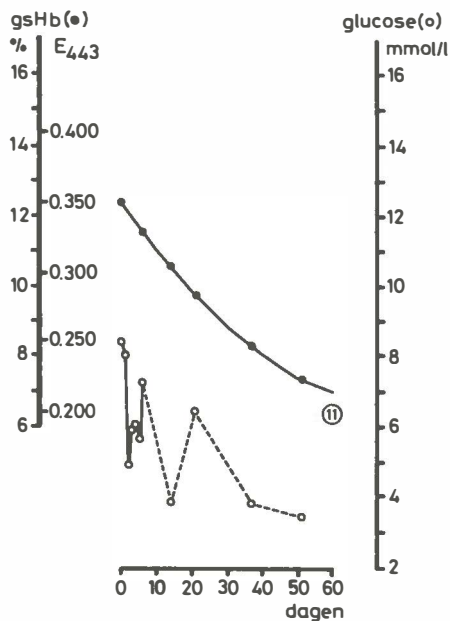
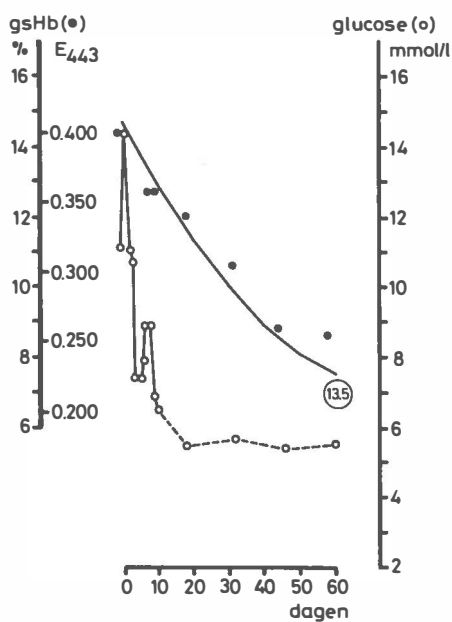
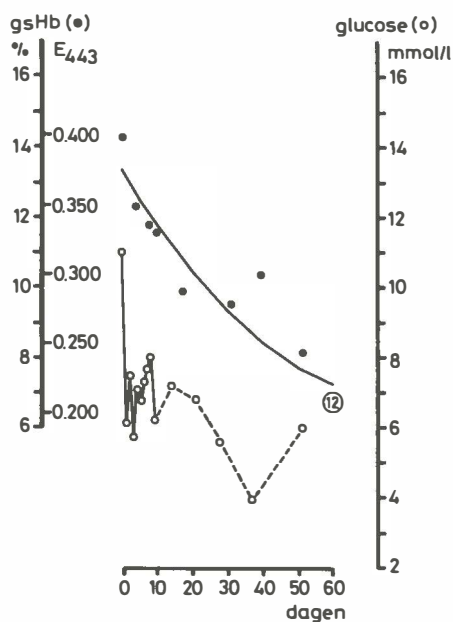
Hieronder wordt verslag gedaan van drie patiënten, waarbij, vanuit een situatie van chronische hyperglycaemie, door middel van C.S.I.I. zo snel als praktisch mogelijk een aanhoudende situatie met normoglycaemie werd bewerkstelligd. Het verloop van gsHb-spiegels wordt hierbij weergegeven. Ter illustratie van het in hoofdstuk 6 beschreven kinetische model is telkenmale tevens aangegeven, hoe de gevonden gsHb-waarden zouden kunnen passen bij een daling van gsHb, zoals door dit model voorspeld kan worden.

7.2 Verloop van gsHb-spiegels bij drie patiënten tijdens behandeling met continue subcutane insuline-infusie; toepasbaarheid van het kinetisch model in deze situatie.

Op de diabetespolikliniek van het Academisch Ziekenhuis te Groningen wordt sinds enige tijd een aantal op conventionele wijze slecht reguleerbare patiënten met diabetes mellitus behandeld met behulp van C.S.I.I. Uit deze groep werden drie patiënten geselecteerd, bij wie na start van de behandeling met C.S.I.I. bloedsuikerspiegels snel normaliseerden, en bij wie gedurende 60 dagen normoglycaemie aanwezig bleef.

Alle drie de patiënten hebben een insuline-afhankelijke diabetes mellitus gedurende minstens 4 jaar. De indicatie voor C.S.I.I. bestond bij patiënte W. en S. uit graviditeit bij instabiele diabetes mellitus; patiënte B. werd verwezen in verband met moeilijk reguleerbare diabetes mellitus met diabetische polineuropathie. De leeftijd bedroeg resp. 25, 24 en 25 jaar.

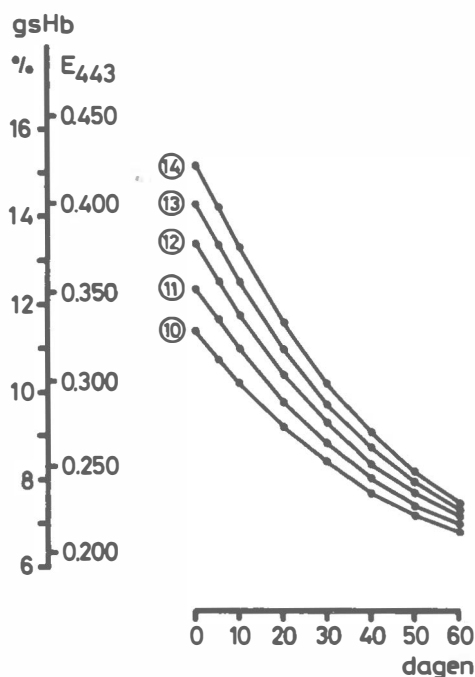
Alle drie werden door specialisten buiten ons ziekenhuis verwezen; getalsmatige gegevens betreffende bloedglucosewaarden, voorafgaande aan C.S.I.I. ontbreken derhalve. De gegevens over gsHb-waarden en bloedglucosewaarden van deze drie patiënten worden gegeven in de figuren 7.1, 7.2 en 7.3. Op dag 0 werd gestart met C.S.I.I. De weergegeven bloedglucosewaarden zijn het gemiddelde van acht bepalingen, die verspreid over de dag werden verricht. Gedurende de eerste zeven tot tien dagen, nadat gestart werd met C.S.I.I. werden dagelijks bloedsuikerdagcurves verricht; de overige waarden geven het gemiddelde weer van poliklinisch verrichte dagcurves. Door de gsHb-waarden is telkenmale een kromme getrokken. Deze lijn representeert de theoretische daling van gsHb-waarden volgens het kinetisch model, waarbij ervan wordt uitgegaan dat na een periode van 120 dagen met een constante mate aan hyperglycaemie, abrupt op dag 0 normalisering van bloedglucosewaarden werd bereikt met vervolgens gedurende 60 dagen een per etmaal constante gemiddelde bloedglucose-waarde van 5 mmol/l. Allereerst werden, gebruik makend van de formule uit Appendix B, gsHb-curves berekend, uitgaand van een constante mate aan hyperglycaemie gedurende 120 dagen voorafgaande aan abrupte normalisatie. De curves voor respectievelijk 10, 11, 12, 13 en 14 mmol/l worden weergegeven in figuur 7.4. Vervolgens werd bij elk van de bovenvermelde



Figuren 7.1, 7.2 en 7.3

Verloop van gsHb-spiegels en de gemiddelden van glucosedagcurves (onderling verbonden door een gesloten lijn tijdens de klinische, en door een onderbroken lijn tijdens de poliklinische periode) bij 3 patiënten tijdens behandeling met C.S.I.I.

De getrokken lijn door de gevonden gsHb-waarden is overgenomen uit figuur 7.4, en stelt de theoretische daling van gsHb-waarden voor.



Figuur 7.4

Berekende daling van gsHb-waarden bij abrupte normalisatie van bloedglucosewaarden tot een constante spiegel van 5 mmol/l, uitgaande van een gedurende 120 dagen voorafgaand gemiddelde bloedglucosespiegel van respectievelijk 14, 13, 12, 11 en 10 mmol/l

drie patiënten de (theoretische) curve gezocht, die het best past bij de reëel gevonden gsHb-waarde(n), direct na het begin van C.S.I.I. Deze curves zijn in de figuren 7.1, 7.2 en 7.3 weergegeven. Bij patiënte S. blijkt dit de curve te zijn, passend bij een voorafgaande gemiddelde bloedglucose-waarde van 12,0 mmol/l; bij patiënte B. 13,5 mmol/l. en bij patiënte W. 11,0 mmol/l. Dit is uiteraard een theoretisch gegeven. De bloedsuiker-waarden daalden bovendien niet abrupt op dag 0; ze bleven evenmin de volgende 60 dagen constant op een niveau van 5 mmol/l. Daarom valt ook niet te verwachten, dat de werkelijk gevonden gsHb-waarden precies op deze lijn vallen.

Wel kan op deze wijze worden gedemonstreerd, dat, bij een verloop van bloedsuiker-waarden als bij de drie bovenvermelde patiënten, de daling van de gsHb-waarden volgens een overeenkomstig patroon verloopt als voorspeld zou kunnen worden door het kinetisch model, beschreven in hoofdstuk 6.

Hoofdstuk 8

GEGLYCOSYLEERD PLASMA-PROTEINE

8.1 *Inleiding.*

Glycosylering beperkt zich niet tot het haemoglobine; in hoofdstuk 1.7.2. is reeds besproken, dat er aanwijzingen zijn dat non-enzymatische binding met suikers ook bestaat bij het kristaleiwit van de oog lens, de eiwitten van de erythrocytenmembraan en bij glomerulaire eiwitten. Van het plasma-albumine en andere plasma-eiwitten is recent gebleken, dat zij eveneens geglycosyleerd zijn (42, 26, 27, 28, 101, zie ook onder 1.7.1.). De hoeveelheid aan geglycosyleerd albumine is colorimetrisch te bepalen door middel van de T.B.A.-methode. Bij patiënten met diabetes mellitus worden hogere spiegels aan geglycosyleerd albumine gevonden dan bij gezonden; na snelle correctie van de hyperglycaemie dalen deze spiegels (101). De kinetiek van het geglycosyleerde albumine en het geglycosyleerde haemoglobine verschillen in deze situatie duidelijk – het geglycosyleerde albumine daalt sneller dan het gsHb (70, 37, 62, 61, 101). Dit verschil in gedrag wordt veroorzaakt door de relatief korte halfwaardetijd van albumine (ongeveer 20 dagen). Op grond hiervan is gesteld, dat een gsHb-spiegel een indruk geeft over de diabetesregeling gedurende de laatste 2-3 maanden, en dat een spiegel aan geglycosyleerd albumine de regeling weergeeft over de laatste 1-3 weken (61).

Een snelle methode tot isolering van het geglycosyleerde albumine blijkt niet beschikbaar te zijn; als alternatief is de bepaling van het geglycosyleerde gedeelte van het totaal aan plasma-proteïnen gesuggereerd (61). Het geglycosyleerde plasma-proteïne (gsprot) blijkt een vrijwel identiek gedrag te vertonen als dat van geglycosyleerd albumine; onderling bestaat er een goede correlatie (28, 61).

In dit hoofdstuk wordt melding gedaan van het verloop van gsprot-spiegels bij twee patiënten met een insuline-afhankelijke diabetes mellitus. Op de onderlinge relatie tussen de gsprot-spiegels en de gsHb-spiegels wordt nader ingegaan. Verder wordt het verloop van gsprot-spiegels en gsHb-spiegels tijdens de behandeling van een pernicioze anaemie besproken bij twee, niet-diabetische patiënten.

8.2 *Bepaling van geglycosyleerd proteïne door middel van de thiobarbituurzuur-methode.*

8.2.1 *Principe.*

Het principe van bepaling van geglycosyleerd proteïne is gelijk aan dat van bepaling van geglycosyleerd haemoglobine; door hydrolyse van het geglycosyleerde eiwit ontstaat 5-hydroxymethylfurfural (H.M.F.), dat na reactie met

thiobarbituurzuur (T.B.A.) een geel product levert. H.M.F.-spiegels kunnen daarna worden gekwantificeerd door de absorptie te meten bij 443 nm.

De bepaling van gsprot vereist echter een hogere oxaalzuurconcentratie (1M.) dan die van gsHb; verder dienen serum en oxaalzuur langer te worden geïncubeerd (4 uur bij 100°C.). Daar 'vrij' glucose bij deze hoge oxaalzuurconcentratie ook leidt tot niet te verwaarlozen HMF productie, dient het mengsel voor bepaling onteiwit te worden (60).

Het koken van het eiwit-neerslag met oxaalzuur dient in verband met kookstoffen plaats te vinden in met ingeslepen stoppen af te sluiten buizen.

8.2.2 *Bepalingsvoorschrift.*

1. 0,25 ml. serum samenvoegen met 2 ml. 96% alcohol
2. 3 minuten krachtig mixen op een reageerbuismixer
3. supernatant afgieten
4. aan het neerslag 1,5 ml. 1 M. oxaalzuur toevoegen
5. mengen en verhitten gedurende 4 uur bij 100°C. in een buis met ingeslepen stop
6. na afkoeling onteiwitten met 0,5 ml. 40% T.C.A.
7. centrifugeren; 1,0 ml. van het supernatant kleuren met 0,25 ml. T.B.A.
8. extinctie meten bij 443 nm. tegen een blanco.

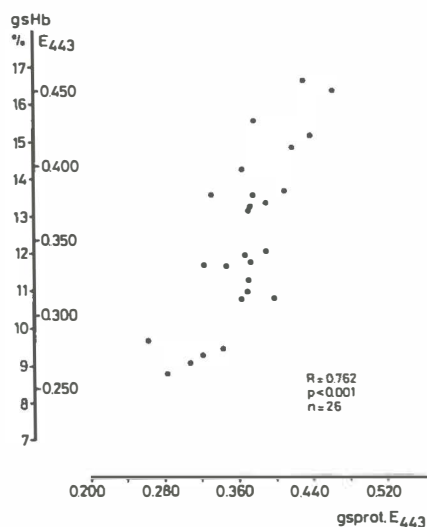
Op deze wijze uitgevoerd vertoont de bepaling een variatiecoëfficiënt van 8,2%.

De kleuropbrengst moet in principe gerelateerd worden aan de serumeiwit-spiegel. Bij intra-individueel onderzoek kan dit achterwege gelaten worden wanneer in de onderzochte periode het serumeiwitgehalte niet verandert.

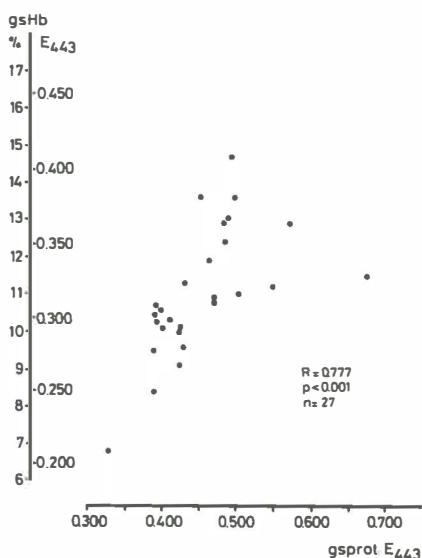
8.3 *Verloop van geglycosyleerd proteïne en geglycosyleerd haemoglobine bij twee patiënten met insuline afhankelijke diabetes mellitus.*

8.3.1 *Opzet van het onderzoek; resultaten.*

In hoofdstuk 4.2.2. werd uitvoerig aandacht geschonken aan het verloop in de tijd van de gsHb-spiegels van twee patiënten met I.D.D.M., patiënt R. (fig. 4.4) en patiënt V. (fig. 4.5). Bij deze twee patiënten werd bij elke gelegenheid, waarbij een gsHb-spiegel werd afgenomen, tevens het gehalte aan gsprot bepaald. De onderlinge correlatie tussen deze beide parameters blijkt goed te zijn; voor patiënt R. bedraagt deze 0,762 (figuur 8.1) en voor patiënt V. 0,777 (figuur 8.2). Het verloop van spiegels aan gsprot en gsHb in de tijd wordt voor patiënt R. weergegeven in figuur 8.3 en voor patiënt V. in figuur 8.4. In tabel 8.1 wordt voor beide patiënten weergegeven de onderlinge correlatie tussen *a* de gsHb-spiegels en de actuele totaalscores, *b* de gsHb-spiegels en de gemiddelden van de totaalscores van de polikliniekbezoeken gedurende de twee



Figuur 8.1
*Patiënt R.; relatie tussen gsHb-
en gsprot-spiegels*



Figuur 8.2
*Patiënt V.; relatie tussen gsHb-
en gsprot-spiegels*

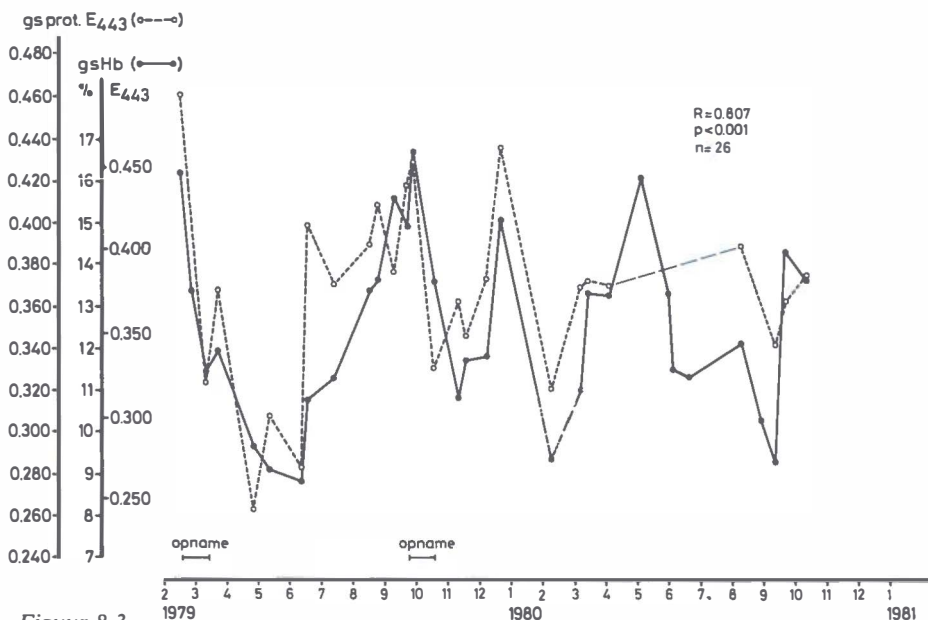
Tabel 8.1

Correlaties	Pat. R	Pat. V
gsHb versus tot.score	R=0,686 n=32 p<0,01	R= 0,059 n=27 p>0,10
gsHb versus tot.score (2 mnd)	R=0,609 n=31 p<0,01	R=-0,004 n=26 p>0,10
gsHb versus gsprot	R=0,762 n=26 p<0,001	R= 0,777 n=23 p<0,001
gsprot versus tot.score	R=0,807 n=26 p<0,001	R= 0,076 n=23 p>0,10
gsprot versus tot.score(2 mnd)	R=0,495 n=25 0<0,02	R=-0,207 n=22 p>0,10

maanden, voorafgaande aan afname van de betreffende gsHb-spiegels (cf. hoofdstuk 4.2.2), *c* de gsHb-spiegels en de gsprot-spiegels, *d* de gsprot-spiegels en de actuele totaalscores en *e* de gsprot-spiegels en de gemiddelden van de totaalscores van de polikliniekbezoeken gedurende de twee maanden, voorafgaande aan de afname van de betreffende gprot-spiegels.

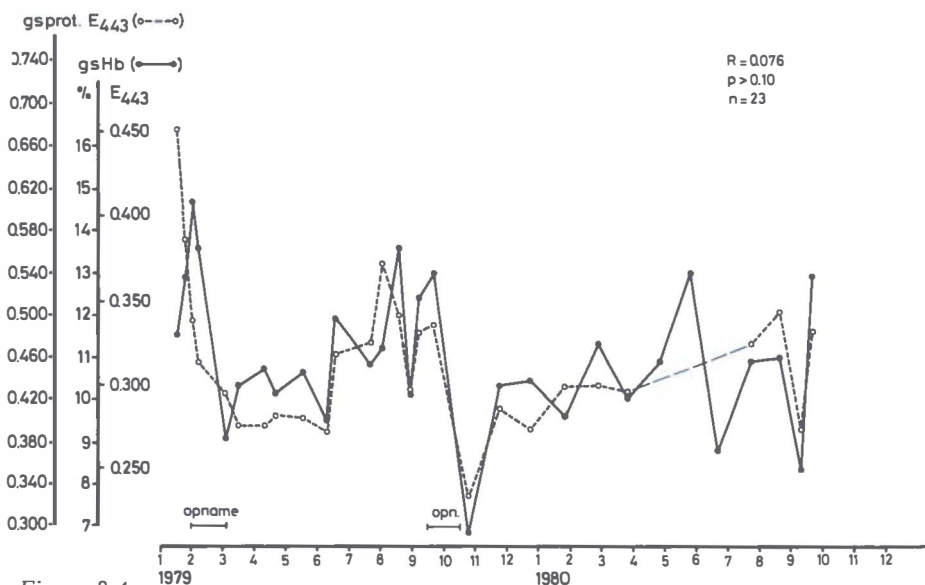
8.3.2 Bespreking van de resultaten.

Het gsHb en het gsprot zijn beide producten, waarvan de vorming berust op éénzelfde fysiologisch principe: de non-enzymatische binding van suikers aan een eiwit-molecuul. Doordat de glucoseconcentratie binnen de erythrocyt onafhankelijk is van insuline, zal zowel het haemoglobine als het plasma-pro-



Figuur 8.3

Patiënt R.; verloop van gsHb- en gsprot-spiegels in de tijd; de gegeven correlatie is die van gsprot-spiegels met de (in deze figuur niet weergegeven) totaalscores (cf. fig. 4.4)



Figuur 8.4

Patiënt V; verloop van gsHb- en gsprot-spiegels in de tijd; de gegeven correlatie is die van gsprot-spiegels met de (in deze figuur niet weergegeven) totaalscores (cf. fig. 4.5)

teïne aan dezelfde concentratie aan suikers worden blootgesteld. Op grond hiervan mag men bij een persoon met een constante bloedsuikerwaarde (zowel bij euglycaemie, als in het hyperglycaemische bereik) verwachten een stabiele hoeveelheid aan gsHb en gsprot aan te treffen. Na een periode met geleidelijk toenemende (of afnemende) bloedsuikerspiegels zal de correlatie met de per etmaal gemiddelde bloedsuikerspiegels goed zijn; in deze situaties kan men een lineaire relatie tussen gsHb en gsprot verwachten.

In situaties, waarbij plotseling een wijziging ontstaat in de mate aan hyperglycaemie (een snelle correctie na een periode met ontregeling of een acute ontregeling na een periode met goede regulatie) zal het gedrag van gsHb en gsprot onderling gaan verschillen. De halfwaardetijd van gsHb is langer dan die van gsprot; de gemiddelde halfwaardetijd van alle plasmaproteïnen bedraagt bij benadering 17 dagen (21). Indien bij een diabeet een bloedmonster wordt afgenomen, korte tijd na een acute verslechtering na een voorafgaande periode met stabiele regeling, zal (door de kortere halfwaardetijd) de gsprot-spiegel sterker gestegen zijn dan de gsHb-spiegel (cf. figuur 8.2; waarden, rechts van de puntenwolk). Indien verhoogde bloedsuikerwaarden blijven bestaan, zal de gsHb-waarde eveneens een sterkere stijging vertonen, waarna de gsHb-en de gsprot-spiegel een ongeveer gelijkwaardige toename zullen hebben vertoond. Indien deze abrupte stijging van bloedsuikerspiegels echter na korte tijd wordt gevolgd door een snelle daling, zullen zowel gsHb- als gsprot-spiegels gaan dalen; door de relatief kortere halfwaardetijd van het gsprot zal de daling hiervan echter scherper inzetten dan die van het gsHb. In deze situatie zal, uitgezet in een figuur als figuur 8.2, een punt, dat zowel de waarde van gsHb als van gsprot weergeeft, weer meer in de puntenwolk terug te vinden zijn.

gsHb-waarden En totaalscores correleren bij patiënt R. goed; bij deze patiënt bleken perioden met geleidelijke verslechtering van de diabetesregulatie zich af te wisselen met perioden met geleidelijke verbetering (cf. hoofdstuk 4.2.4). Op bovenvermelde gronden mag men verwachten, dat gsprot-waarden niet slechter correleren met de totaalscores dan de gsHb-waarden. De correlatiecoëfficiënten van de actuele totaalscores bedroegen bij deze patiënt 0,686 (gsHb) en 0,807 (gsprot). Tevens mag men aannemen, dat, gezien de relatief kortere halfwaardetijd van het gsprot, de correlatie van deze parameter met de gemiddelde totaalscores gedurende twee maanden, voorafgaande aan afnemende, minder goed zal zijn dan de correlatie tussen actuele totaalscores en de actuele gsprot-spiegels. De gegevens, gevonden bij patiënt R., zijn hiermede niet in tegenspraak (tabel 8.1).

Bij patiënt V. bestonden frequent optredende fluctuaties in diabetesregeling; de gsHb-waarden bij deze patiënt vertoonden geen correlatie met de totaalscores (cf. hoofdstuk 4.2.4). De gsprot-spiegels blijken evenmin te correleren met de totaalscores (tabel 8.1). Op grond hiervan zou men kunnen veronderstellen, dat de frequentie van fluctuaties in diabetes-regulering bij deze patiënt nog hoger ligt dan blijkt uit figuur 4.5. Desondanks correleren gsprot- en gsHb-spiegels bij deze sterk fluctuerende glucosewaarden uitstekend.

Concluderend blijkt, dat de bepaling van het geglycosyleerd plasma-proteïne een overeenkomstige waarde heeft voor de behandeling van een patiënt met

diabetes mellitus, als de bepaling van geglycosyleerd haemoglobine (cf. hoofdstuk 4.2.4). De correlatie met parameters voor actuele diabetesregulatie kunnen (bij insuline-afhankelijke diabeten) van persoon tot persoon sterk verschillen.

Wel kan bij een diabetes-patiënt een zeer recente ontregeling worden vermoed, indien blijkt, dat, vergeleken met voorafgaande waarden, de gsprot-spiegel sterker is toegenomen dan de gsHb-spiegel.

8.4 *Verloop van geglycosyleerd haemoglobine en geglycosyleerd proteïne bij twee, niet-diabetische patiënten, tijdens behandeling van een pernicieuze anaemie.*

8.4.1 *Inleiding.*

In het voorgaande (hoofdstuk 1.2) is reeds besproken, dat de glycosylering van haemoglobine afhankelijk is van de volgende variabelen: 1 de hoogte van de bloedsuikerspiegels, 2 de duur van de blootstelling van haemoglobine aan bloedsuikerspiegels van verschillende hoogte en 3 de levensduur van de erythrocyten. Hieruit volgt, dat bij een constante bloedsuikerspiegel de gsHb-spiegel een functie is van de overlevingsduur van de erythrocyten. Indien bij een normoglycaemische patiënt een haemolytische anaemie bestaat, kan derhalve een gsHb-spiegel worden verwacht, die lager dan normaal is. In een dergelijke situatie zal men echter wel normale gsprot-spiegels aantreffen; de halfwaardetijd van plasma-eiwitten blijft immers normaal.

Hieronder wordt bij twee patiënten het verloop, tijdens de behandeling van een pernicieuze anaemie, van gsHb- en gsprot-spiegels besproken.

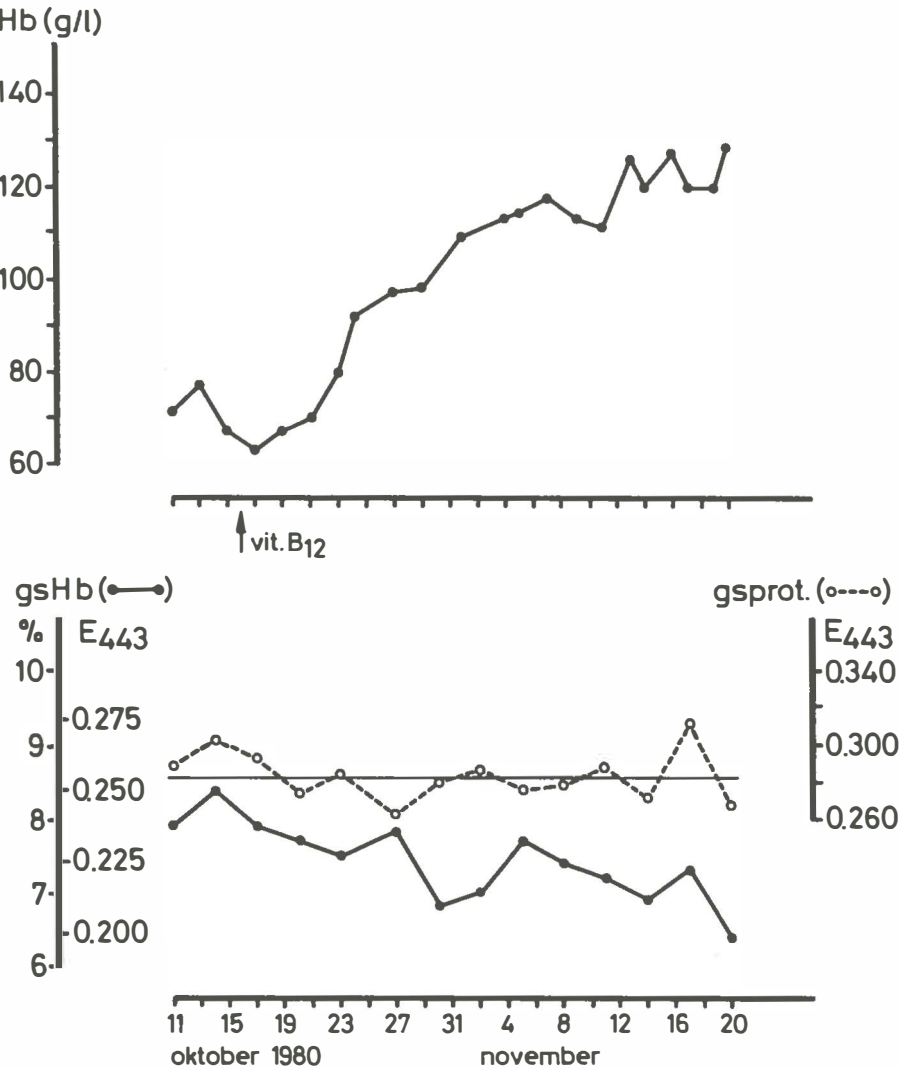
8.4.2 *Onderzoek en bespreking van resultaten.*

De biochemische gegevens van de twee (niet-diabetische) patiënten met een pernicieuze anaemie zijn weergegeven in tabel 8.2. Bij beiden bestonden aan-

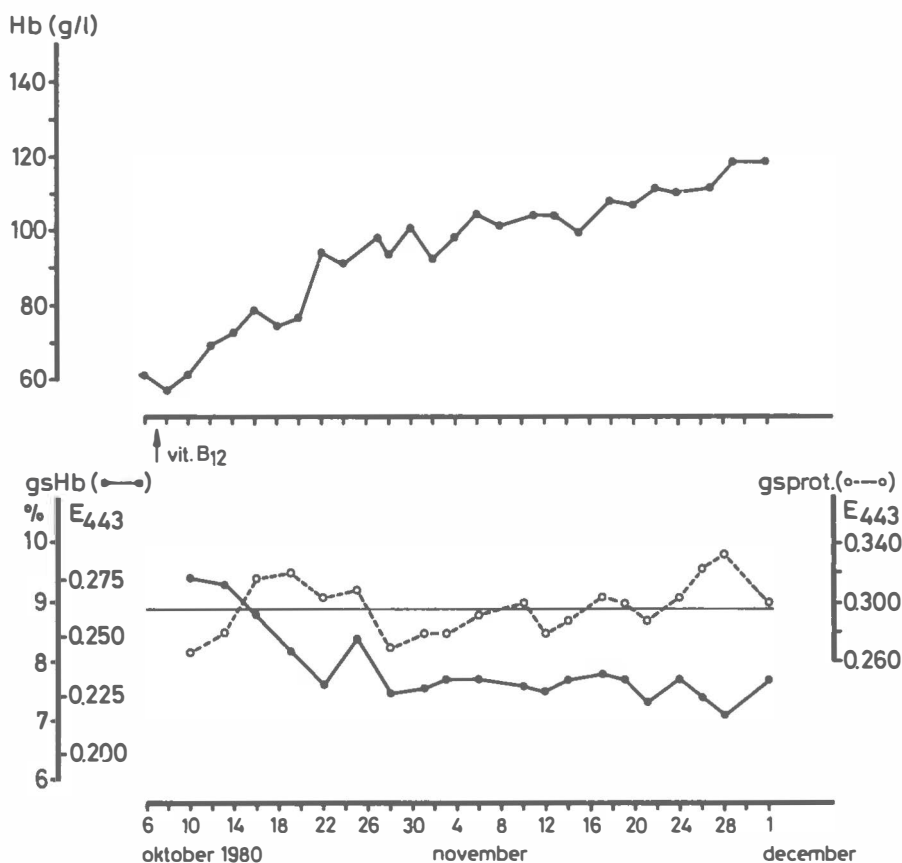
Tabel 8.2

	Patiënt I	Patiënt II
Hb (g/l)	71	61
m.c.v. (μ) ³	122	114
leuco's ($\times 10^9$ /l)	2,1	2,0
thrombo's ($\times 10^9$ /l)	97	80
reticulocyten (% ₀₀)	10	8
L.D.H. (U/l; n < 235)	41.400	960
foliumzuur (nmol/l; n > 6,5)	21,4	20,9
vitamine B ₁₂ (pmol/l; n > 185)	49	5,8
anti-pariëtaalcel-a.l.	neg.	pos.
pH nuchtere maaginhoud	8,08	8,09
Schilling test; recovery/48 hr.	0,5%	0,7%

wijzingen voor het bestaan van een polyneuropathie; het beenmerg vertoonde in beide gevallen een megaloblastair beeld. Nadat de Schilling-test was verricht, ontstond een reticulocytenrise met een maximum aan reticulocyten voor patiënt I na vijf dagen (120 ‰) en voor patiënt II na drie dagen (226 ‰). Tijdens de observatieperiode bleven de spiegels aan totaal eiwit in het serum bij beiden constant.



Figuur 8.5
Patiënt I; verloop van haemoglobineconcentratie, gsHb- en gsprot-spiegels na behan-
deling met vitamine B₁₂



Figuur 8.6
Patiënt II; verloop van haemoglobineconcentratie, gsHb- en gsprot-spiegels na behandeling met vitamine B₁₂

Het verloop in de tijd van het haemoglobine-gehalte, de gsHb-spiegels en de gsprot-spiegels is weergegeven in figuur 8.5 (patiënt I) en figuur 8.6 (patiënt II). Deze drie parameters vertonen een bij beide patiënten vergelijkbaar gedrag. Vóór behandeling blijken de gsHb-spiegels hoog-normaal, respectievelijk verhoogd te zijn (een derde, hier niet besproken patiënt vertoonde eveneens verhoogde gsHb-spiegels, variërend van 8,1 tot 8,6%). Dit is niet in overeenstemming met hetgeen werd verwacht. Pernicieuze anaemie kenmerkt zich immers onder meer door een uitgesproken dyserythropoiese en een afgenomen overlevingsduur van de erythrocyten (variërend van 27 tot 75 dagen). Op grond hiervan zou een verlaagde gsHb-spiegel worden verwacht. Een verklaring voor verhoogde gsHb-spiegels kan door ons niet worden gegeven; de oorzaak zal gezocht dienen te worden in andere factoren als onderdeel van de

complexe pathofysiologie van de pernicioze anaemie, dan alleen de verkorte overlevingsduur van de erythrocyten. Zo wordt bij patiënten met een pernicioze anaemie een met een factor van twee tot drie verhoogde activiteit aan glycolytische enzymen in de rode cel aangetroffen (40). Bij patiënten met een strikt-haemolytische anaemie worden in de literatuur wel verlaagde gsHb-spiegels beschreven (cf. hoofdstuk 1.2); een door ons behandelde patiënt met een sikkelcelanaemie bleek een gsHb-spiegel van 4,6% te hebben.

Het verloop van de gsHb-spiegels na behandeling met vitamine B₁₂ is conform de verwachtingen. De daling van de gsHb-spiegels kan verklaard worden door de massale erythropoiese. Hierdoor zal een toenemend gedeelte van de circulerende rode cellen beladen zijn met haemoglobine, dat door een korte expositie-duur aan bloedsuikers slechts in geringe mate geglycosyleerd is.

De gsprot-spiegels vertonen, overeenkomstig de verwachtingen, geen duidelijke wijzingen.

SUMMARY

During the last decade, increasing interest has shed light on hitherto unknown epiphenomenon of diabetes mellitus: the increased glycosylation of proteins. At first, it was discovered, that the haemolysate of diabetic patients, when submitted to kation exchange chromatography, yielded the three haemoglobin subfractions A_{1a} , A_{1b} and A_{1c} in a higher concentration than the haemolysates of controls. In the years to come, these subfractions were identified as products of an aspecific, non-enzymatic linkage of glucose or glucose-metabolites to haemoglobin. In this way, the haemoglobin subfraction A_{1c} appeared to contain the condensation product of haemoglobin and glucose. Later on, the estimation in a simple way of the amount of the HbA_{1c} -fraction was made possible by the introduction of commercially available micro-column kits. The introduction of these kits seemed justified in the face of the growing (and still lasting) belief among physicians, that measurement of the HbA_{1c} -fraction provides a reliable index for the integral of blood glucose variations of their diabetic patients during the last two to three months.

This study was undertaken as an effort to answer a few questions in regard to the use of HbA_{1c} -levels as an index for glycaemic control of diabetic patients. These questions are: 1 do HbA_{1c} -levels indeed provide a reliable index for the glycaemic control of diabetic patients, and 2 holds this true, for as well the insulin-dependent (I.D.D.M.) as for the non-insulin-dependent (N.I.D.D.M.) diabetic patients, 3 do HbA_{1c} -levels provide a diagnostic tool, based on which a therapeutic regimen could be changed, 4 how long is the period, of which a single HbA_{1c} -level informs about the glycaemic control.

Two groups of diabetic patients were studied: group A, consisting of 9 patients with N.I.D.D.M., and group B, with 20 I.D.D.M.-patients. These patients were followed on the out-patients' department. On the occasion of each visit, the following parameters of diabetic control were taken: as 'classical' parameters the blood glucose level and the amount of glucosuria during the preceeding 24 hours, and, for comparison, the level of glycosylated haemoglobin (gsHb).

For the estimation of gsHb, we used the T.B.A.-test, a colorimetric method, highly specific for the keto-amine linked protein-hexose products. This simple test has shown to have a very good correlation with estimations by kation exchange chromatography.

Blood sugar levels and the amount of glucosuria were 'translated' into a blood-score and an urine-score respectively; addition of these two provides a total-score, representing the degree of metabolic regulation. Correlations between gsHb levels and total-scores in N.I.D.D.M. patients appear to be good; in I.D.D.M. patients, however, these two parameters correlate less well. The correlations, calculated in individual patients in this last group, show a wide variation, ranging from excellent to not existent. In two patients of the I.D.D.M.-type, gsHb levels and total-scores were plotted on a time-base. The patient, in whom gsHb levels and total scores correlated well, shows periods

of a slowly improving degree of regulation, alternating with periods of slowly progressing to frank dysregulation. The other patient, in whom gsHb levels and total-scores did not correlate, shows marked fluctuations in regulation over relatively short periods of time. In order to understand this phenomenon, a mathematical model was constructed, describing the changes in the fraction of glycosylated haemoglobin in relation to blood sugar changes. In this model, as factors, responsible for an increase in gsHb are taken to be blood sugar levels and time of exposition of haemoglobin to these blood sugar levels, and as factors, responsible for a decrease in gsHb, the reversibility of the glycosylated product and the erythrocyte survival time. The reaction constants for the formation of the glycosylated haemoglobin and the break down of this

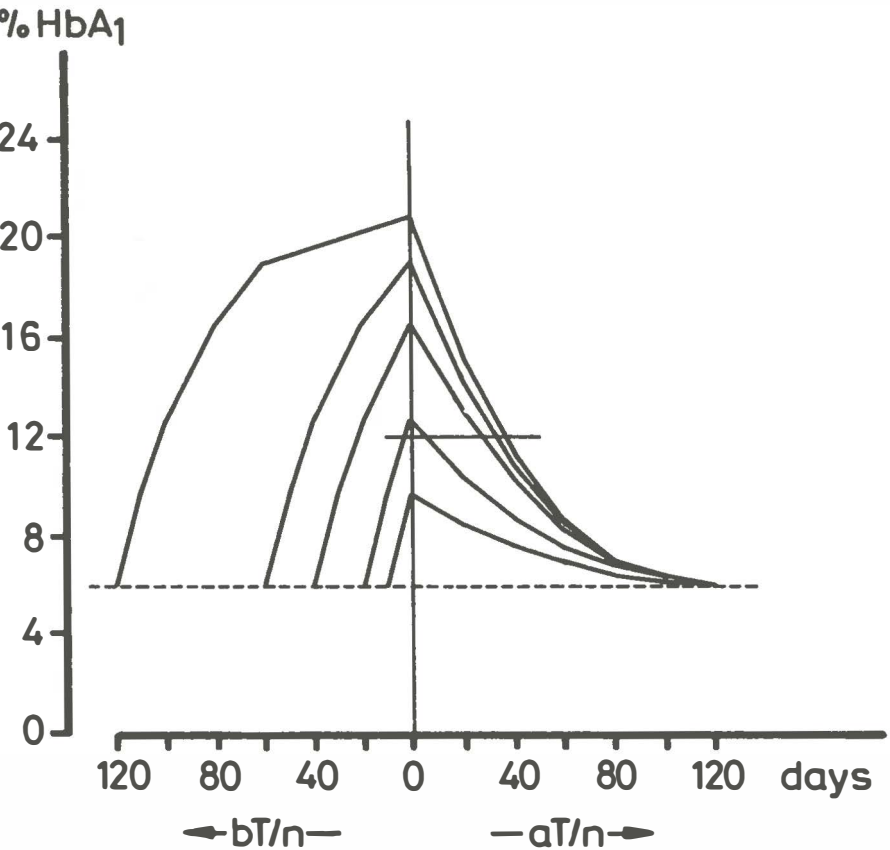


Figure S.1
The changes in HbA₁-fraction due to a rise of the glucose from a normal level of 5 mmol/l to 20 mmol/l for variable periods of bT/n days, followed by a normalisation of the glucose level for aT/n days, in normal erythrocytes
(The horizontal line at 12% is explained in the text)

product respectively, were chosen in a way, that calculations by this model fit the experimental data of Bunn et al (13).

Using the formula, derived in Appendix B, changes of the HbA₁-fraction can be calculated. In figure S.1, HbA₁-levels are given, assuming a constant mean level of glucose of G3 = 5 mmol/l, followed by a constant level of G2 = 20 mmol/l during a variable period of bT/n days and a restoration of the glucose level G1 = 5 mmol/l during a variable period of aT/n days.

As noticeable in figure S.1, the model predicts slightly different half times for a rise and a decrease in HbA₁. For the combination shown (5 and 20 mmol/l) we find a half time of 24 days for an increase, whereas that of a decrease is dependent of the duration of the glucose rise, ranging from 25 days for bT/n = 120 days to 33 days for bT/n = 5 days. From the model-predicted changes it is easily seen that a single determination of HbA₁ does not inform us about the history of the glucose level. A value of 12% may indicate that the level has been 5 mmol/l except for a period with a mean level of 20 mmol/l that started 19 days ago, or for a period of 20 days that ended 5 days ago, or for 40 days ending 26 days ago, or for 60 days ending 32 days ago, etc. (figure S.1, along the horizontal line from left to right). Of course other time relations are to be expected with glucose changes of other magnitude, but the conclusion is the same: an elevated HbA₁-level does only inform of a past derangement of the glucose level, without giving insight on magnitude, length or date of that derangement.

In figure S.1 the change in HbA₁-fraction due to a single derangement is given. In case of several derangements of shorter length, the changes in % HbA₁ are smaller, though the absolute glucose level during a dysregulation is of the same magnitude. In figure S.2, using the formula given in Appendix B, the changes in HbA₁, due to a glucose level alternating every 20 days from 5 to 20 mmol/l, or vice versa, are depicted. If in a period of 240 days such a patient had been seen with intervals of 14 days, there would be no correlation between actual HbA₁-value and actual glucose level (figure S.3a) and no correlation between actual HbA₁-value and the mean of the glucose values measured at the four visits in the preceeding six weeks (figure S.3b). Again the model predicts an elevated level of HbA₁ at each moment. So, after a completely normal period of three weeks the level is still 12% instead of 6% that would be more appropriate for the actual situation, whereas after a three week's derangement the level is only 15% instead of the more appropriate 21%.

Another indication, that calculations by the kinetic model fit patient-derived results, was gathered by treating diabetic patients by continuous subcutaneous insulin infusion (C.S.I.I.). Three patients treated in this way, were selected. After initiation of C.S.I.I., mean blood glucose levels and gsHb levels were recorded. The decline in gsHb levels followed a similar pattern as could have been predicted by the model.

The fact, that gsHb levels, apart from variations in blood glucose levels, are also dependent of changes in mean red cell age, is illustrated by the course of gsHb levels in two non-diabetic patients, during treatment of a pernicious

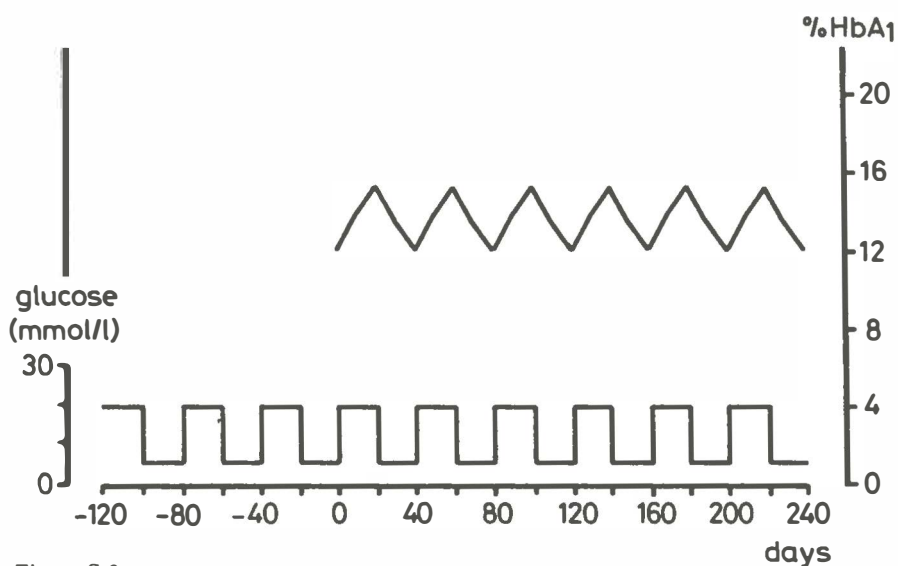


Figure S.2

The changes in HbA₁-fraction due to alternating periods of 20 days with glucose levels of 5 and 20 mmol/l respectively

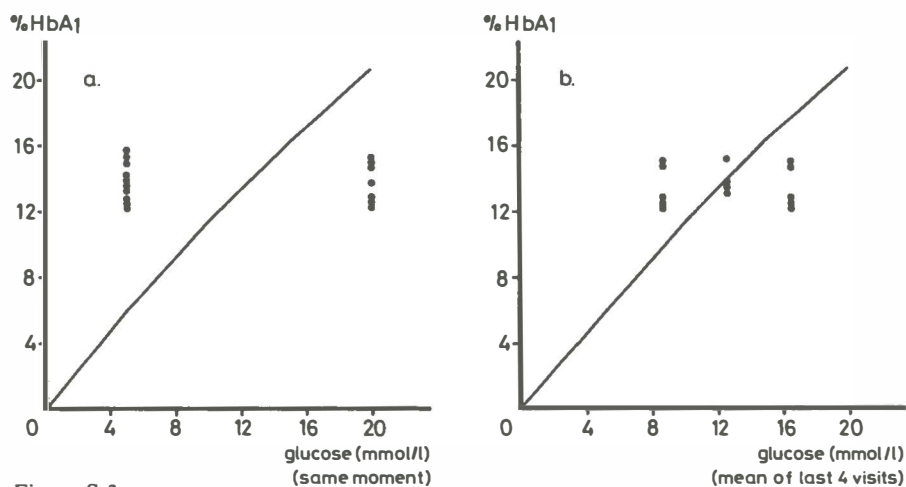


Figure S.3

a. HbA₁-values plotted against glucose levels in the model-patient of fig. S.2 at intervals of 14 days for 240 days

b. HbA₁-values plotted against the mean of 4 glucose levels in the preceding 6 weeks, lying 2 weeks apart

(The lines indicate the expected relationship if the glucose level had been constant)

anaemia. After vitamin B₁₂-substitution, there was a marked decrease in gsHb levels, reflecting the overwhelming number of young red cells, in which haemoglobin has not yet had a sufficient exposure time to glucose or its metabolites, to become glycosylated. During the same period, levels of glycosylated protein did not show a decrease, thus reflecting the constancy of the glycosylation, and indicating, that the cause of decreasing gsHb levels must be a decrease in mean red cell age.

The estimation of glycosylated protein (gsprot) in evaluating the metabolic control of diabetic patients has recently been advocated. Half-life time of protein is shorter than that of haemoglobin, and levels would reflect glycaemic control of diabetic patients during a shorter period of time than gsHb levels. In the two I.D.D.M. patients, mentioned above, also gsprot levels were estimated. In the patient in which gsHb levels correlated well with total-scores, gsprot levels also showed a good correlation. In the other patient, nor gsHb levels, nor gsprot levels correlated with the total-scores. In both patients, gsHb and gsprot values correlated well. On a theoretical base, in view of the shorter half-life time of proteins, gsprot levels indeed will reflect glycaemic control during a shorter period of time than gsHb levels. In the individual patient with I.D.D.M. however, gsprot appears to have no advantage to gsHb in evaluating metabolic control.

In short, the practical conclusions of this thesis are as follows:

Estimating levels of glycosylated haemoglobin provides a reliable index for the glycaemic control of N.I.D.D.M. patients; in these patients with rather constant blood glucose levels however, this new parameter seems to have no specific advantage to measurement of blood glucose levels. In I.D.D.M. patients, gsHb levels will or will not reflect glycaemic control, depending on the rate of fluctuations in regulation. In the individual patient therefore, it does not provide a tool, based on which a therapeutic regimen could be changed. The same remarks are valid in regard to the possible diagnostic value of estimating levels of glycosylated protein.

Litteratuur

1. Abraham, E.C. e.a. Determination of the glycosylated hemoglobins (HbA₁) with a new microcolumn procedure. *Diabetes*: 27; 931, 1978.
2. Abraham, E.C. e.a. On the chromatographic heterogeneity of human fetal hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta*: 577; 159, 1979.
3. Alberti, K.G.M.M. e.a. 2,3 Diphosphoglycerate and tissue oxygenation in uncontrolled diabetes mellitus. *Lancet* II; 391, 1972.
4. Allen, D.W. e.a. Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: a study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J. Amer. Chem. Soc.*: 80; 1628, 1958.
5. Artuson, G. e.a. Oxygen affinity of whole blood in vivo and under standard conditions in subjects with diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*: 34; 19, 1974.
6. Van Ballegooie, E. De behandeling van diabetes mellitus met continue subcutane insuline-infusie. *N.T.v.G.*: 124; 2038, 1980.
7. Beisswenger, P.J. e.a. Studies on the human glomerular basement membrane. Composition, nature of the carbohydrate units and chemical changes in diabetes mellitus. *Diabetes*: 22; 180, 1973.
8. Berger, W. e.a. Blutzuckertagesprofile und Hämoglobin A_{1c} bzw. A_{1c} zur Ueberwachung der Diabetesbehandlung. *Schweiz. Med. Wschr.*: 110; 485, 1980.
9. Bookchin, R.M. e.a. Structure of hemoglobin A_{1c}: nature of the N-terminal β chain blocking group. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*: 32; 86, 1968.
10. Brooks, A.P. e.a. Iron deficiency and glycosylated haemoglobin A₁. *Lancet* II; 141, 1980.
11. Bunn, H.F. e.a. The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J. Clin. Invest.*: 49; 1088, 1970.
12. Bunn, H.F. e.a. Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*: 67; 103, 1975.
13. Bunn, H.F. e.a. The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation in vivo. *J. Clin. Invest.*: 57; 1652, 1976.
14. Bunn, H.F. e.a. Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *J. Biol. Chem.*: 254; 3892, 1979.
15. Casparie, A.F. e.a. Glycosylated haemoglobin in diabetes and renal failure. *Lancet* II; 759, 1977.
16. Cerami, A. Cyanate as an inhibitor of red cell sickling. *N. Engl. J. Med.*: 287; 807, 1972.

17. Cerami, A. e.a. Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus. *Metabolism*: 28, no. 4 suppl. 1; 431, 1979.
18. Chanutin. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch. Biochem.*: 121; 96, 1967.
19. Charitanski, D. e.a. Contrôle du diabète non traité par l'insuline; 107 observations. *Nouv. Presse Méd.*: 9; 585, 1980.
20. Chiumello, G. e.a. *Excerpta Medica* no. 481, pg. 42, 1979.
21. Ciba-Geigy, *Wissenschaftliche Tabellen*, 6. Auflage.
22. Clegg, M.D. e.a. A chromatographic study of the minor components of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals. *J. Amer. Chem. Soc.*: 81; 6065, 1959.
23. Cole, R.A. e.a. A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobins using high pressure liquid chromatography. *Metabolism*: 27; 289, 1978.
24. Dandona, P. e.a. Glycosylated haemoglobin in chronic renal failure. *B.M.J.* I; 1183, 1979.
25. Danowski e.a. Sodium, potassium, org. phosphates in the cells and serum of blood in diabetic acidosis. *Am. J. Physiol.*: 149; 667, 1947.
26. Day, J.F. e.a. Nonenzymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum. *J. Biol. Chem.*: 254; 595, 1979.
27. Day, J.F. e.a. Nonenzymatic glucosylation of rat albumin. Studies in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*: 254; 9394, 1979.
28. Day, J.F. Nonenzymatic glucosylation of serum proteins and hemoglobin: responses to changes in blood-glucose levels in diabetic rats. *Diabetes*: 29; 524, 1980.
29. Ditzel, J. e.a. Tissue oxygenation in uncontrolled diabetes mellitus. *Lancet* II; 818, 1972.
30. Ditzel, J. e.a. The oxygen transport system of red blood cells during diabetic ketoacidosis and recovery. *Diabetologia*: 11; 255, 1975.
31. Ditzel, J. ea. The problem of tissue oxygenation in diabetes mellitus. I. Its relation to the early functional changes in the microcirculation of diabetic subjects. *Acta Med. Scand.*: Suppl. 578; 49,, 1975.
32. Ditzel, J. e.a. The problem of tissue oxygenation in diabetes mellitus. II. Evidence of disordered oxygen release from the erythrocytes of diabetics in various conditions of metabolic control. *Acta Med. Scand.*: Suppl. 578; 59, 1975.
33. Ditzel, J. e.a. The problem of tissue oxygenation in diabetes mellitus. III. The 'three-in-one concept' for the development of diabetic microangiopathy and a

- rational approach to its prophylaxis. *Acta Med. Scand.*: Suppl. 578; 69, 1975.
34. Ditzel, J. e.a. Oxygen affinity of haemoglobin and red cell 2,3-diphosphoglycerate in childhood diabetes. *Acta Paediatr. Scand.*: 64; 355, 1975.
 35. Ditzel, J. e.a. An adverse effect of insulin on the oxygen-release capacity of red blood cells in nonacidotic diabetics. *Metabolism*: 27; 927, 1978.
 36. Ditzel, J. e.a. Hemoglobin A_{1c} and red cell oxygen release capacity in relation to early retinal changes in newly discovered overt and chemical diabetics. *Metabolism*: 28, no. 4 Suppl. 1; 440, 1979.
 37. Dolhofer, R. e.a. Different behaviour of haemoglobin A_{1a-c} and glycosyl-albumin levels during recovery from diabetic ketoacidosis and non-acidotic coma. *Diabetologia*: 21; 211, 1981.
 38. Mc.Donald, M.J. Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J. Biol. Chem.*: 253; 2327, 1978.
 39. Dunn, P.J. e.a. Reproducibility of hemoglobin A_{1c} and sensitivity to various degrees of glucose intolerance. *Ann. Int. Med.*: 91; 390, 1979.
 40. Lewis, S.M. (Ed.). *Dyserythropoiesis*. Academic Press Inc. Ltd.; pg. 225, 1977.
 41. Faber, O.K. e.a. C-peptide response to glucagon. A test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus. *Diabetes*: 26; 605, 1977.
 42. Mc.Farland, K.F. e.a. Nonenzymatic glucosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes*: 28; 1011, 1979.
 43. Fitzgibbons, J.F. e.a. Red cell age-related changes of hemoglobins A_{1a-b} and A_{1c} in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.*: 58; 820, 1976.
 44. Flock, E.V. e.a. Bimodality of glycosylated hemoglobin distribution in Pima Indians; relationship to fasting hyperglycemia. *Diabetes*: 28; 984, 1979.
 45. Flückiger, R. e.a. In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. *Febs Letters*: 71; 356, 1976.
 46. Flückiger, R. *Struktur, Funktion und Synthese von Haemoglobin A_{1c}*. Universität Basel Ph.D. Dissertation, 1978.
 47. Flückiger, R. e.a. Hemoglobin carbamylation in uremia. *New Engl. J. Med.*: 304; 823, 1981.
 48. Fraser, D.M. e.a. Glycosylated haemoglobin concentrations in newly diagnosed diabetics before and during treatment. *B.M.J.*: 1; 979, 1979.
 49. Gabbay, K.H. e.a. Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*: 44; 859, 1977.
 50. Gabbay, K.H. e.a. Glycosylated Hemoglobins: increased glycosylation of hemo-

globin A in diabetic patients. *Diabetes*: 28; 337, 1979.

51. Gonen, B. e.a. Metabolic control in diabetic patients. Effect of insulin-secretory reserve (measured by plasma C-peptide levels) and circulating insulin antibodies. *Diabetes*: 28; 749, 1979.
52. Gonen, B. e.a. Metabolic control in diabetic patients: assessment by hemoglobin A₁ values. *Metabolism*: 28; no. 4 Suppl. 1, 448, 1979.
53. Graf, R.J. e.a. Glycosylated hemoglobin in normal subjects and subjects with maturity-onset diabetes; evidence for a saturable system in man. *Diabetes*: 27; 834, 1978.
54. Grajwer, L.A. e.a. Control of juvenile diabetes mellitus and its relationship to endogenous insulin secretion as measured by C-peptide immunoreactivity. *J. Pediatr.*: 90; 42, 1977.
55. Haney, D.N. e.a. Glycosylation of hemoglobin in vitro: affinity labeling of hemoglobin by glucose-6-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73; 3534, 1976.
56. Holmquist, W.R. e.a. A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A_{1c}. *Biochemistry*: 5; 2489, 1966.
57. Horton, B.F. e.a. Studies on the heterogeneity of hemoglobin. VII. Minor hemoglobin components in hematological diseases. *Br. J. Haematol.*: 11; 296, 1965.
58. Huisman, T.H.J. e.a. Studies on the heterogeneity of hemoglobin I. The heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in Amberlite IRC-50 chromatography: qualitative aspects. *Clin. Chim. Acta*: 5; 103, 1960.
59. Jos, J. e.a. Dosage de l'hémoglobine glycosylée A_{1c}; contrôle du diabète juvénile insulino-dépendant. *Nouv. Presse Med.*: 9; 2053, 1980.
60. Kennedy, A.L. Nonenzymatically glycosylated serum protein: spurious elevation due to free glucose in serum. *Diabetes*: 29; 413, 1980.
61. Kennedy, A.L. e.a. Glycosylated serum protein and hemoglobin A₁ levels to measure control of glycemia. *Ann. Int. Med.*: 95; 56, 1981.
62. Kennedy, L. e.a. Non-enzymatically glycosylated serum protein in diabetes mellitus: an index of short-term glycaemia. *Diabetologia*: 21; 94, 1981.
63. Kern, H.L. e.a. Sodium cyanate-induced ocular lesions in the beagle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 200; 10, 1977.
64. Kesson, C.M. e.a. Drug-induced haemolysis and fast haemoglobin A₁ in diabetes mellitus. *B.M.J.*: 6197; 1037, 1979.
65. Krishnamoorthy, R. e.a. Isoelectrofocusing: a method of multiple applications for hemoglobin studies. *Clin. Chim. Acta*: 69; 203, 1976.

66. Kutter, D. Application du dosage des hémoglobines 'rapides' à la surveillance et au diagnostic du diabète sucré. *Schweiz. Med. Wschr.*: 109; 1107, 1979.
67. Leslie, R.D.G. e.a. Fast glycosylation of haemoglobin. *Lancet* I; 773, 1979.
68. Lev-Ran, A. e.a. Glycohemoglobins and glucose tolerance. *JAMA*: 241; 912, 1979.
69. Lubec, G. e.a. Glomerular basement membrane changes, HbA_{1c} and urinary excretion of acid glycosaminoglycans in children with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta*: 103; 45, 1980.
70. Ma, A. e.a. Glycosylated plasma protein: a simple method for the elimination of interference by glucose in its estimation. *Clin. Chim. Acta*: 115; 111, 1981.
71. Menard, L. e.a. Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A₁ by agar gel electrophoresis. *Clinical Chemistry*: 26; 1598, 1980.
72. Mc.Millan, D.E. e.a. Reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Diabetes*: 27; 895, 1978.
73. Miller, J.A. e.a. Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. *J. Clin. Invest.*: 65; 896, 1980.
74. Mortenson, H.B. Measurement of hemoglobin A_{1c} using thin layer isoelectric focusing. *Acta Endocr.*: 94, Suppl. 237; 62, 1980.
75. Numan, W. Factoren die de insuline gevoeligheid beïnvloeden. Rijks Universiteit Groningen; dissertatie, 1980.
76. Peterson, C.M. e.a. Reversible hematologic sequelae of diabetes mellitus. *Ann. Int. Med.*: 86; 425, 1977.
77. Reynolds, C. e.a. Abnormalities of endogenous glucagon and insulin in unstable diabetes. *Diabetes*: 26; 36, 1977.
78. Saibene, V. e.a. Chromatographic and colorimetric detection of glycosylated haemoglobins; a comparative analysis of two different methods. *Clin. Chim. Acta*: 93; 199, 1979.
79. Santiago, J.V. e.a. Hemoglobin A_{1c} levels in a diabetic detection program. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*: 47; 578, 1978.
80. Sato, T. e.a. Comparison of the chemical composition of glomerular and tubular basement membranes obtained from human kidneys of diabetics and non-diabetics. *Clin. Chim. Acta*: 61; 145, 1975.
81. Schnek, A.G. e.a. The relation between the whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. *J. Amer. Chem. Soc.*: 83; 1472, 1961.
82. Schoor, R. e.a. Dosage of hemoglobin A_{1c} by isoelectrofocusing. *Clin. Chim. Acta*: 86, 61, 1978.

83. Service, F.J. e.a. Effect on hemoglobin A₁ of rapid normalization of glycemia with an artificial endocrine pancreas. *Mayo Clin. Proc.*: 56; 377, 1981.
84. Shapiro, R. e.a. Nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin at multiple sites. *Metabolism*: 28, no. 4 Suppl. 1; 427, 1979.
85. Shima, K. e.a. Relationship between diabetic instability and insulinogenic reserve. *Diabetes*: 26; 717, 1977.
86. Sluiter, W.J. e.a. Glycosylated haemoglobin and iron deficiency. *Lancet II*; 531, 1980.
87. Solway, J. e.a. Biosynthesis of glycosylated hemoglobins in the monkey. *J. Lab. Clin. Med.*: 93; 962, 1979.
88. Spicer, K.M. e.a. A simplified assay of hemoglobin A_{1c} in diabetic patients by use of isoelectric focusing and quantitative micro-density. *Diabetes*: 27; 384, 1978.
89. Spiro, R.G. Search for a biochemical base of diabetic micro-angiopathy. *Diabetologia*: 12; 1, 1976.
90. Standl, E. e.a. 2,3-Diphosphoglycerate fluctuations in erythrocytes reflecting pronounced blood glucose variations. *Diabetologia*: 9; 461, 1973.
91. Stevens, V.J. e.a. Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*: 252; 2998, 1977.
92. Stevens, V.J. Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 75; 2918, 1978.
93. Svendsen, P.A. e.a. Fast glycosylation of haemoglobin. *Lancet I*; 603, 1979.
94. Svendsen, P.A. e.a. Studies on the rapid glycosylation of haemoglobin. *Acta Endocr.*: 94, Suppl. 237; 76, 1980.
95. Svendsen, P.A. e.a. Rapid changes in chromatographically determined haemoglobin A_{1c} induced by short-term changes in glucose concentration. *Diabetologia*: 19; 130, 1980.
96. Trivelli, L.A. e.a. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*: 284; 353, 1971.
97. Mc.Verry, B.A. e.a. Production of pseudodiabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections of glucosylated proteins. *Lancet I*; 738, 1980.
98. Welch, S.G. Fast glycosylation of haemoglobin. *Lancet I*; 728, 1979.
99. Welinder, B.S. e.a. Heterogeneity of the haemoglobin-A_{1c}-band in isoelectric focusing. *Diabetologia*: 19; 465, 1980.
100. Widness, J.A. e.a. Rapid fluctuations in glycohemoglobin (hemoglobin A_{1c}) related to acute changes in glucose. *J. Lab. Clin. Med.*: 95; 386, 1980.

101. Wieland, O.H. e.a. Glycosylation of haemoglobin and of serum albumin in diabetes mellitus. *Excerpta Medica*: no. 500; 721, 1979.
102. Winterhalter, K.H. Glykosylierte Haemoglobine und ihre Bedeutung beim Diabetes Mellitus. *Schweiz. Med. Wschr.*: 109; 1105, 1979.
103. Yalow, R. e.a. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*: 39; 1157, 1960.

APPENDIX A

GROEP A (9 patiënten)

naam patiënt	aantal contrôles	geslacht	lengte (m)	gewicht (kg)	leeftijd (jr)	dieet (d) orale anti- diabetica (o.a.)	% normaal gewicht
GO	6	vr.	1.64	79,6	63	d	119
G	10	mn.	1.71	73	50	d + o.a.	99
Ha	7	mn.	1.72	85	72	d	116
Hu	8	vr.	1.47	55	72	d + o.a.	95
d J	3	mn.	1.67	65	65	d	94
Ku	6	vr.	1.63	62	68	d	94
La	7	mn.	1.79	82	71	d	103
Le	7	vr.	1.57	66,5	33	d	117
Sm	20	vr.	1.51	73-61,2	73	d	124-104

GROEP B (20 patiënten)

naam patiënt	aantal contrôles	geslacht	lengte (m)	gewicht (kg)	leeftijd (jr)	gemiddelde insuline substi- tutie (E/24 hr)	% normaal gewicht
Baa	6	vr.	1.62	60,3	38	40	101
Bee	15	vr.	1.74	57,5	30	24	86
Ber	23	mn.	1.73	73	29	32-52	104
Bl	9	vr.	1.63	61	53	28	93
Br	7	mn.	1.81	75,5	28	60	99
v D	1	mn.	1.67	59	77	28	85
F	17	mn.	1.94	86,5	24	28	105
Gr	5	vr.	1.70	69	59	40	98
d G-D	18	vr.	1.68	64,8	35	44	103
t H	4	vr.	1.74	69	18	48	112
He	7	vr.	1.74	61	62	32	83
Kui	16	vr.	1.66	61,4	22	60	107
v M	18	vr.	1.70	62	36	32	96
O	12	mn.	1.72	75	20	40	112
P	14	mn.	1.95	75	21	54	90
R	32	mn.	1.70	66	30	68	93
Sl	7	mn.	1.89	70,5	25	80	85
V	29	mn.	1.75	70	68	56	92
d V	13	mn.	1.74	73,5	42	56	97
W	5	mn.	1.71	67	72	24	92

APPENDIX B

Let us divide the whole living population of red cells in a large number of n cohorts with an age difference per cohort of T/n days. If the glucose level was initially G_3 for at least T days, followed by a period of bT/n days with a level of G_2 and finally by a period of aT/n days with a level of G_1 , we can calculate the fraction of HbA_1 during the whole interval for any set of combinations of bT/n and aT/n .

When the cohorts are numbered from the youngest to the oldest, then any young cohort x with $x \leq a$ experienced only a glucose level G_1 . The fraction fA in such a cohort is

$$fA_x = \frac{k_1 G_1}{k_1 G_1 + k_2} (1 - e^{-(k_1 G_1 + k_2)xT/n})$$

The contribution to the overall mean fraction mfA of all these young cohorts together is

$$mfA_1 = (1/T) \int_0^{aT/n} fA_x dx = \frac{k_1 G_1}{k_1 G_1 + k_2} (a/n - \frac{1}{(k_1 G_1 + k_2)T} + \frac{e^{-(k_1 G_1 + k_2)aT/n}}{(k_1 G_1 + k_2)T})$$

When we call $(k_1 G_1 + k_2) = p$, we get

$$mfA_1 = (k_1 G_1/p) (a/n - 1/pT + e^{-paT/n}/pT).$$

The somewhat older cohorts x with $a < x \leq (a + b)$ experienced first a level G_2 for a variable period of $(x - a)T/n$ days, followed by a fixed period of aT/n days with a level of G_1 . Therefore the fraction fA in such a cohort is, when $q = (k_1 G_2 + k_2)$:

$$fA_x = (k_1 G_1/p) (1 - e^{-paT/n}) + (k_1 G_2/q) (1 - e^{-q(x-a)T/n}) e^{-paT/n}.$$

Through integration we find the contribution of these cohorts together to the overall mean fraction mfA :

$$mfA_2 = (bk_1 G_1/p) (1 - e^{-paT/n}) + (k_1 G_2/q) (b/n - 1/qT + e^{-qbT/n}/qT) e^{-paT/n}.$$

In a similar way we calculate for the remaining oldest $(n-a-b)$ cohorts, when $r = (k_1 G_3 + k_2)$, the fraction

$$fA_x = (k_1 G_1/p) (1 - e^{-paT/n}) + (k_1 G_2/q) (1 - e^{-qbT/n}) e^{-paT/n} \\ + (k_1 G_3/r) (1 - e^{-r(n-a-b)T/n}) e^{-paT/n} e^{-qbT/n}.$$

Again, through integration, we find the contribution of these cohorts to the overall mean fraction mfA :

$$mfA_3 = (n-a-b) (k_1 G_1/np) (1 - e^{-paT/n}) + (n-a-b) (k_1 G_2/nq) (1 - e^{-qbT/n}) e^{-paT/n} \\ + (k_1 G_3/r) ((n-a-b)/n - 1/rT + e^{-r(n-a-b)T/n}/rT) e^{-paT/n} e^{-qbT/n}.$$

Addition leads to the overall mean fraction $mfA = mfA_1 + mfA_2 + mfA_3 =$

$$\begin{aligned}
& (k_1 G_1/p) [a/n + (1 - e^{-paT/n}) ((n-a)/n - 1/pT)] + \\
& (k_1 G_2/q) [b/n + (1 - e^{-qbT/n}) ((n-a-b)/n - 1/qT)] e^{-paT/n} + \\
& (k_1 G_3/r) [(n-a-b)/n + (1 - e^{-r(n-a-b)T/n}) (-1/rT)] e^{-paT/n} e^{-qbT/n}.
\end{aligned}$$

In general, for n periods, each with a variable length of t_i days and with a variable glucose level of G_i mmol/l, we find the equation given below. In this general formula, we call $i = 1$ for the last period and $i = n$ for the period that started T days ago.

$$mfA = \sum_{i=1}^n \left[\frac{k_1 G_i}{k_1 G_i + k_2} \left\{ \frac{t_i}{T} + (1 - e^{-(k_1 G_i + k_2) t_i}) \left(\frac{T - \sum_{j=1}^i t_j}{T} - \frac{1}{(k_1 G_i + k_2) T} \right) \right\} e^{-\sum_{j=1}^{i-1} (k_1 G_j + k_2) t_j} \right]$$